

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal I)



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de una UDPG-dh (UDP-Glucosa
deshidrogenasa) de "Xanthomonas albilineans" y su papel
en la patogenicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Blanch Rojo

DIRECTORES:

Carlos Vicente Córdoba
María Estrella Legaz González

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



532562986X

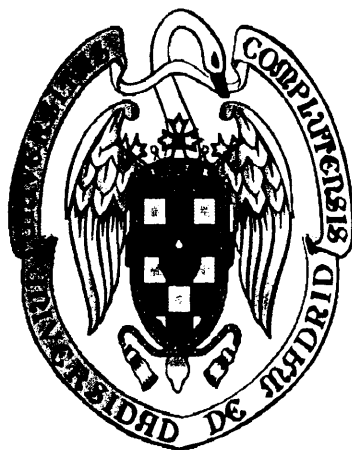
T581.2
BLA
Car

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DPTO. DE BIOLOGÍA VEGETAL I

(CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL)



**CARACTERIZACIÓN DE UNA UDPG-dh (UDP-GLUCOSA
DESHIDROGENASA) DE *Xanthomonas albilineans* Y SU PAPEL
EN LA PATOGENICIDAD.**

TESIS DOCTORAL

MARÍA BLANCH ROJO

MADRID, 2007

635794100

MARÍA BLANCH ROJO

**CARACTERIZACIÓN DE UNA UDPG-dh (UDP-GLUCOSA
DESHIDROGENASA) DE *Xanthomonas albilineans* Y SU PAPEL
EN LA PATOGENICIDAD**

Directores

Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba

**Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias
Biológicas**

Prof.Dra. D^a. María Estrella Legaz González

**Catedrática de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias
Biológicas**

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Dpto. Biología Vegetal I

(Cátedra de Fisiología Vegetal I)

Madrid, 2007

Todo este trabajo ha podido llegar a su fin gracias a un numeroso grupo de personas que han estado a mi lado durante todo este tiempo.

En primer lugar debo agradecer de manera muy especial la ayuda brindada por el Prof. Dr. D Carlos Vicente Córdoba, Catedrático de Fisiología Vegetal de esta Facultad de Biología. Sin él hubiese sido imposible el poder llegar a finalizar este trabajo. La constancia y paciencia que ha mostrado tener durante todo este tiempo conmigo ha sido indispensable para poder llegar hasta aquí. Su forma de ser, el cariño y la dedicación mostrada a lo largo de este tiempo hace que sea un orgullo haber podido trabajar con él.

Quisiera también mostrar mi más sincero agradecimiento a mi codirectora de tesis la Prof. Dra. D^a María Estrella Legaz, Catedrática de Fisiología Vegetal de esta Facultad de Biología. El tiempo compartido, las horas de dedicación que ha pasado conmigo y todas las vivencias que me ha transmitido las cuales me han servido para formarme no solo en el ámbito de la investigación sino también en mi vida personal, han sido fundamentales. Sus ánimos y el cariño transmitido han sido de gran ayuda para poder afrontar las dificultades que durante este tiempo me han surgido.

De todo corazón os doy las gracias por todo lo que me habéis ayudado, lo que he podido aprender a vuestro lado y el aprecio que he recibido por vuestra parte durante todo este tiempo ha hecho que os sienta como de mi propia familia.

La realización de esta tesis ha contado con la colaboración de varios investigadores cubanos de los que me gustaría mencionar; de manera especial al Prof. Dr. D. Roberto de Armas y al Ing. Agr. D. Carlos W. Rodríguez. Sus estancias en el laboratorio me han servido de mucho en la puesta a punto de diversas metodologías aplicadas en este trabajo.

Quisiera agradecer al Dr. Miguel Vicente-Manzanares por la ayuda prestada en la secuenciación del extremo N-terminal de la enzima UDPG-deshidrogenasa así como a la Prof. Dra. D^a María Teresa Solas por su ayuda en lo referente a la microscopía que ha sido de especial utilidad en este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer la ayuda prestada por D. Agustín Legaz, su dedicación e ingenio al diseñar una prensa que me ha permitido poder extraer los jugos de la caña de azúcar, tan importantes en la realización de esta tesis.

Quisiera agradecer a mis compañeras de laboratorio los momentos vividos durante todo este tiempo. Rocío, Ana, Blanca, Mercedes, Mara y Yolanda. El día a día con ellas me ha servido para poder compartir conocimientos y una buena amistad. Mis agradecimientos se extienden a los Profesores Drs. Adolfo Ávalos y Elena Pérez-Urría, al Prof. Dr. Jesús Palá-Paul, Mayte, David y Raquel que de una u otra forma tanto me han ayudado durante todos estos años.

La impecable asistencia técnica de Bernabé Bodas y Juan José Grajera en el mantenimiento y puesta a punto de los aparatos de Electroforesis Capilar, me ha permitido el poder llevar a cabo parte de esta investigación.

La ayuda del equipo del Taller Mecánico de la Universidad Complutense, dirigido por Florentino Zapatera y el equipo de jardineros del Real Jardín Botánico Alfonso XII, que han hecho posible que podamos investigar con la caña de azúcar crecida en el invernadero.

A Fernando por aceptarme tal y como soy. Por quererme como me quiere y ayudarme de manera incondicional siempre que lo necesito. Es una suerte el poder compartir mi vida con él.

Por último quiero dar las gracias a mis amigos, y familia, en concreto a mis padres por dármele todo, por quererme tanto y estar siempre a mi lado. Sin su ayuda hoy no estaría aquí.

Muchas gracias a todos.

AMPC	Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico
CVC	Clorosis variegada de los cítricos
DHAP	dihidroxiacetona-fosfato
EPs	Polisacáridos extracelulares
FDA	Food and Drug Administration
GlcA	Ácido glucurónico
HMMC	Carbohidratos solubles de alto peso molecular
HMMG	Glicoproteínas de alto peso molecular
MAL	Ácido málico
MMMC	Carbohidratos solubles de mediano peso molecular
MMMG	Glicoproteínas de mediano peso molecular
OAA	Ácido oxalacético
PA	Ácido pirúvico
PEP	ácido fosfoenolpirúvico
PGA	Ácido 3-fosfoglicérico
PKS	Proteína quinasa multifuncional
SDS	Dodecil sulfato sódico
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
TTAOH	Hidróxido de tetradeciltrimetilamonio
UDPG	Uridina difosfoglucosa
UDPG-dh	Uridina difosfoglucosa deshidrogenasa
UDP-GlcA	Uridina difosfo ácido glucurónico

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR.....	3
1.2. ASPECTOS BOTÁNICOS: TAXONOMÍA, MORFOLOGÍA, CICLO BIOLÓGICO Y FISIOLOGÍA.....	6
1.3. MADURACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR	13
1.3.1. Condiciones de maduración de la caña de azúcar	14
1.4. PRODUCCIÓN DE HETEROFRUCRANOS EN CAÑA DE AZÚCAR.....	17
1.4.1. Naturaleza de los polisacáridos solubles de caña de azúcar	19
1.4.2. Origen de los polisacáridos solubles.....	20
1.4.3. Los heterofructanos de caña como mitad polisacáridica de glicoproteínas	21
1.4.4. Alteración producida en el proceso de cristalización de la sacarosa originado por las glicoproteínas de caña de azúcar.....	24
1.5. LA ESCALDADURA FOLIAR	25
1.5.1. Historia y distribución.....	25
1.5.2. Fases y síntomas de la enfermedad.....	26
1.5.3. Transmisión y control de la enfermedad	29
1.5.4. <i>Xanthomonas albilineans</i> . Organismo causal de la escal- dadura foliar en la caña de azúcar.....	30
1.5.5. La albicidina como factor de virulencia.....	32
1.6. XANTANO	38
1.6.1. Características generales del xantano	38
1.6.2. Estructura	39
1.6.3. Propiedades reológicas	40
1.6.4. Interacción con otras gomas	41
1.6.5. Toxicidad	43
1.6.6. Aplicaciones.....	43
1.6.7. Proceso de producción del xantano.....	45
1.6.8. Variables del proceso	45

1.6.9. <i>Xylella fastidiosa</i>	48
1.6.9.1. Las proteínas involucradas en transporte	49
1.6.9.2. Adhesión	51
1.6.9.3. La migración entre vasos conductores	54
1.6.9.4. La toxicidad	54
1.7. XANTANO DE <i>Xanthomonas albilineans</i>	55
1.8. UDP-Glucosa Deshidrogenasa	57
2. OBJETIVOS	63
3. MATERIAL Y MÉTODOS	65
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	67
3.2. OPTIMIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE LA UDP-Glucosa Deshidrogenasa	68
3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA UDPG-deshidrogenasa	69
3.4. PURIFICACIÓN DE LA UDPG-deshidrogenasa	70
3.5. SEPARACIÓN DE LA UDPG-deshidrogenasa MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR Y DETERMINACIÓN DE SU pI	71
3.5.1. Acondicionamiento del capilar y condiciones de análisis	71
3.5.2. Determinación del pI y la masa molecular de la enzima UDPG-deshidrogenasa	73
3.5.3. Separación del ácido UDP-glucurónico de la UDPG mediante Electroforesis Capilar	74
3.5.3.1. Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo)	74
3.5.3.2. Cromatografía micelar electrocinética	74
3.5.3.3. Electroforesis Capilar con polaridad ánodo-cátodo	75

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LA UDPG-deshidrogenasa.....	76
3.6.1. Cinética de saturación por sustrato	76
3.6.2. Cinética de reacción frente a diferentes concentraciones de NADPH.....	76
3.6.3. Temperatura y pH óptimo de la enzima.....	77
3.6.4. Secuenciación del extremo N-terminal de UDPG-deshidrogenasa.....	77
 3.7. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR	 78
 3.8. SEPARACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DE ALTO Y MEDIANO PESO MOLECULAR MEDIANTE CRO- MATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	 78
3.8.1. Valoración de azúcares.....	79
 3.9. PRODUCCIÓN DE UDPG-deshidrogenasa EN PRESEN- CIA DE INHIBIDORES	 80
 3.10. VALORACIÓN DEL XANTANO PRODUCIDO POR <i>Xanthomonas albilineas</i> TRAS LA INFECCIÓN DE TALLOS PROCEDENTES DE CAÑA DE AZÚCAR	 81
3.10.1. Preparación de las muestras y aislamiento del xantano.....	81
3.10.2. Fraccionamiento	83
3.10.3. Hidrólisis ácida y extracción de azúcares	83
3.10.4. Valoración del xantano por Electroforesis Capilar	85
3.10.5. Ensayo de actividad proteasa.....	85
 3.11. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE LA SACAROSA ORIGINADAS POR EL XANTANO PRODUCIDO POR <i>Xanthomonas albilineas</i>.....	 86
3.11.1. Material vegetal utilizado.....	86
3.11.2. Metodología de la inoculación.....	86
3.11.3. Tratamiento de las muestras en el laboratorio	87
3.11.4. Clarificación del jugo	87
3.11.5. Purificación del xantano	88

4. RESULTADOS	89
4.1. PURIFICACIÓN Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa, NADPH-DEPEDIENTE, PROCEDENTE DE LA BACTERIA <i>Xanthomonas albilineans</i>	91
4.1.1. Cinética de producción de la UDPG-deshidrogenasa	91
4.1.2. Purificación de la UDPG-deshidrogenasa	93
4.1.3. Separación del ácido UDP-glucurónico producido durante la reacción de la UDPG sustrato mediante Electroforesis Capilar.....	95
4.1.3.1. <i>Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad y Cromatografía Micelar Electrocínética</i>	<i>95</i>
4.1.3.2. <i>Separación electroforética con polaridad ánodo-cátodo</i>	<i>103</i>
4.1.4. Caracterización de la enzima UDPG-deshidrogenasa.....	104
4.2. PAPEL DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR Y EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa	109
4.3. ESTUDIO DEL XANTANO PRODUCIDO POR <i>Xanthomonas albilineans</i> OBTENIDO TRAS LA INFECCIÓN DE TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR	115
4.4. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE LA SACAROSA ORIGINADAS POR EL XANTANO PRODUCIDO POR <i>Xanthomonas albilineans</i>	126
5. DISCUSIÓN	133
5.1. <i>Xanthomonas albilineans</i> ES UNA BACTERIA PRODUC- TORA DE XANTANOS	135
5.2. PURIFICACIÓN Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa, NADPH-DEPENDIENTE PROCEDENTE DE LA BACTERIA <i>Xanthomonas albilineans</i>	136

5.3. PAPEL DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR Y EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa	140
5.4. ESTUDIO DEL XANTANO PRODUCIDO POR <i>Xanthomonas albilineans</i> OBTENIDO TRAS LAS INFECCIÓN DE TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR	144
5.5. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE LA SACAROSA ORIGINADAS POR EL XANTANO PRODUCIDO POR <i>Xanthomonas albilineans</i>.....	148
5.5.1. Concepto de cristalización y tipos de Cristales	148
5.5.1.1. Tipos de cristales.....	148
5.5.2. Crecimiento, propiedades de los cristales y velocidad de cristalización	150
6. CONCLUSIONES.....	155
7. BIBLIOGRAFÍA	159

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciación de los tallos en caña de azúcar. Tomado de Humbert, 1974.....	7
Figura 2: Partes estructurales de la hoja en caña de azúcar.....	8
Figura 3: Distribución de las raíces en caña de azúcar. Tomado de Blackburn, 1991	9
Figura 4: Partes de una inflorescencia en caña de azúcar. A) estambres, B) estigmas y C) ovarios.....	9
Figura 5: Representación esquemática de los acontecimientos producidos durante la etapa de maduración	15
Figura 6: Carga y descarga del floema. Posible mecanismo de transporte de sacarosa entre el órgano productor y el órgano consumidor.	17
Figura 7: Síntesis y transporte de glicoproteínas a la pared celular.....	23
Figura 8: Cristales de sacarosa obtenidos a partir de soluciones saturadas de azúcar. En A: agua destilada; B: HMMG en una solución acuosa; C: MMMG en una solución acuosa. (Fontaniella <i>et al.</i> , 2003 a).....	24
Figura 9: Síntoma característico de la infección causada por la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> en la caña de azúcar en la fase crónica de la enfermedad (a y b)	27
Figura 10: Germinación de yemas laterales y proliferación de "lalas" debidas a la enfermedad	28
Figura 11: Magnificación de una sección transversal de hoja enferma mostrando el notable aumento de las células buliformes como consecuencia de los primeros síntomas de desecación. El patógeno está confinado en los haces vasculares de tallo y hojas, los cuales están a menudo parcialmente ocluidos por un exudado gomoso segregado por la bacteria, identificado como un xantano. Se puede apreciar un relieve muy irregular de la epidermis abaxial.	28
Figura 12: Colonias de <i>Xanthomonas albilineans</i> crecidas en medio Wilbrink.....	31
Figura 13: Organización de una parte del cluster genómico responsable de la biosíntesis de la albicidina. La situación y dirección de los tres ORFs (Open Reading Frame) están indicados con las flechas de mayor grosor. Las líneas verticales indican la posición de las enzimas de restricción: E, <i>EcoRI</i> ; B, <i>Bam</i> HI; S, <i>SpeI</i> ; N, <i>NcoI</i> . Las líneas verticales con triángulos (Δ) indican la posición de los lugares mutagénicos o el lugar de inserción Tn5, y los mutantes resultantes están indicados entre paréntesis. Las flechas situadas encima del mapa físico indican la situación de los primers utilizados para amplificar la secuencia <i>downstream</i> del lugar de restricción de <i>EcoRI</i> mediante IPCR. Las regiones clonadas mediante ensayos de complementación se muestran debajo del mapa.	33
Figura 14: Mapa de restricción de los clones incluyendo el gen <i>xabA</i> de <i>Xanthomonas albilineans</i> . La situación y dirección de la transcripción de <i>xabA</i> , y los demás ORFs indicados mediante la secuencia de análisis, están señalados por flechas. El evidente terminador transcripcional está indicado como Δ ; el promotor \Leftarrow ; RBS \bullet . Las enzimas de restricción utilizadas son: E, <i>EcoRI</i> ; P, <i>PstI</i> ; C, <i>ClaI</i> ; y H, <i>HindIII</i>	34
Figura 15: Reacción de formación del heterociclo tiazol por acción del primer módulo de una policetona sintasa (PKS).....	35
Figura 16: Las últimas deshidrataciones que conducen a la estructura final de las epotilonas.....	36

Figura 17: Estructura del xantano de <i>Xanthomonas campestris</i> . $M^+ = Na, K \text{ o } \frac{1}{2} Ca$	40
Figura 18: Interacción entre el xantano y el galactomanano	42
Figura 19: Esquema del proceso de obtención del xantano.....	46
Figura 20: Esquema representativo del proceso bioquímico que involucra a <i>Xylella fastidiosa</i> en la patogenicidad y supervivencia en el xilema del hospedador.	50
Figura 21: Estructura del xantano de <i>Xylella fastidiosa</i> . $M^+ = Na, K \text{ o } \frac{1}{2} Ca$	53
Figura 22: Ampliación de una sección transversal de hoja enferma de caña de azúcar mostrando depósitos de exudado gomoso (eg) que obtura los elementos floemáticos (ph) mientras que las células del mesófilo (mc) que ocupan la capa inmediatamente adyacente a la epidermis adaxial (ue) y las de la vaina (bsc), así como los grandes elementos xilemáticos (xy) que no contienen aparentemente material de relleno. La epidermis abaxial (le) muestra un relieve muy regular.....	55
Figura 23: Una vista general del corte transversal de una hoja enferma de caña de azúcar completamente ocupada por grandes masas de exudado gomoso que enmascara toda la estructura interna foliar	56
Figura 24: Estructura del xantano de <i>Xanthomonas albilineans</i> . $M^+ = Na, K \text{ o } \frac{1}{2} Ca$	57
Figura 25: Biosíntesis de UDP-glucosa, UDP-galactosa y UDP-glucuronato	59
Figura 26: Mecanismo de acción de la UDP-glucosa deshidrogenasa en humanos.....	62
Figura 27: Plantas de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L) del cultivar Barbados 42-231, crecidas en el invernadero del Real Jardín Botánico Alfonso XIII (Universidad Complutense de Madrid)	67
Figura 28: Esquema representativo del ensayo de medida de la actividad de la enzima UDPG-deshidrogenasa	69
Figura 29: Esquema detallado del protocolo utilizado para llevar a cabo la purificación de la enzima UDPG-deshidrogenasa.	72
Figura 30: Estructura química de los inhibidores Piperina, 8- Azaguanina y Cloranfenicol.	80
Figura 31: Perfil de elución de una mezcla de azul dextrano y $CoCl_2$ filtrada a través de dos columnas consecutivas de Sephadex G-10 y G-50. El azul dextrano y el cloruro de cobalto se monitorizaron por medida de la densidad óptica de las diferentes fracciones en sus máximos de absorción, 620 nm y 510 nm respectivamente.	82
Figura 32: Esquema del proceso de la valoración del xantano producido por <i>Xanthomonas albilineans</i> tras la infección de tallos de caña de azúcar	84
Figura 33: Proceso de inoculación con <i>Xanthomonas albilineans</i> en tallo de caña de azúcar de 9 meses de edad de la variedad Barbados 42-231	87
Figura 34: (A) Influencia de la aireación en la oxidación de NADPH por UDPG-deshidrogenasa a partir de un extracto libre de células de <i>Xanthomonas albilineans</i> cultivadas durante 24 h en medio Wilbrink. Los valores son la media de tres réplicas. (B) Producción de UDPG-deshidrogenasa por <i>Xanthomonas albilineans</i> transcurridas 24 h suplementando el medio de cultivo Wilbrink con sacarosa 58 mM (■), glucosa 58 mM(●) o una mezcla equimolar de ambos azúcares (▲). Los valores son la media de tres réplicas.....	92
Figura 35: Efecto del AMP cíclico (0,5 mM) sobre la producción de UDPG-deshidrogenasa en medios suplementados con glucosa 58 mM (●), frente a medios suplementados con glucosa 58 mM y sin AMP cíclico (■). Los valores son la media de tres réplicas.....	93

Figura 36: Variación del contenido proteico en las fracciones obtenidas a partir de un extracto libre de células tras la filtración a través de la columna Dowex.....	94
Figura 37: (A) Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar, de la enzima UDPG-deshidrogenasa de <i>Xanthomonas albilineans</i> donde se muestra un único pico con un tiempo de migración de 32,44 min. La detección se realizó a 200nm. (B) Análisis semilogarítmico a partir de valores de pI conocidos pertenecientes a una serie de proteínas patrón frente a tiempos absolutos de migración en Electroforesis Capilar, donde 1= invertasa de levadura con un (pI 4,0); 2 = ferritina de caballo con un (pI 4,4); 3 = albúmina bovina con un (pI 4,9); 4 = alcohol deshidrogenasa con un (pI 5,4); 5 =anhidrasa carbónica con un (pI 5,8); 6 =mioglobina con un (pI 7,0); 7 = citocromo c con un (pI 10,6); y 8 = invertasa purificada procedente del liquen <i>Evernia prunastri</i> con un (pI 13,0). (C) Representación semilogarítmica de la relación entre el logaritmo del peso molecular de varias proteínas patrón frente a tiempos de migración absolutos en Electroforesis Capilar, donde 1 = catalasa (240 kDa); 2 = alcohol deshidrogenasa (150 kDa); 3 = anhidrasa carbónica (29 kDa); 4 = mioglobina (17,8 kDa); 5 = citocromo c (12,5 kDa) y 6 = ferredoxina de espinaca (6 kDa).....	96
Figura 38: (A) Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una muestra patrón de UDP-glucosa preparada a una concentración de 1,0 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm. (B) Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una muestra patrón de ácido UDP-glucurónico preparada a una concentración de 1,0 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm	97
Figura 39: (A) Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una muestra patrón de UDP-glucosa preparada a una concentración de 0,5 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm. (B) Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una muestra patrón de ácido UDP-glucurónico preparada a una concentración de 0,5 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm	98
Figura 40: Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una mezcla de patrones de UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico a una concentración de 0,5 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm	99
Figura 41: (A) Electroferograma obtenido mediante cromatografía micelar electrocinética a partir de una muestra patrón de UDP-glucosa preparada a una concentración de 1,0 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm. (B) Electroferograma obtenido mediante cromatografía micelar electrocinética a partir de una muestra patrón de ácido UDP-glucurónico preparada a una concentración de 1,0 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm. (C) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una mezcla de patrones preparados a una concentración de 1,0 mg mL ⁻¹ . La detección se realizó a 214 nm.....	101
Figura 42: (A) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una muestra control de reacción (sin UDP-glucosa). La detección se realizó a 214 nm. (B) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una muestra de reacción (conteniendo el sustrato de la reacción, enzima y cofactor). La detección se realizó a 214 nm	102

Figura 43: (A): Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar a partir de una mezcla de UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico preparados a una concentración de 1,0 mg mL ⁻¹ cada uno. La detección se realizó a 200 nm. (B): Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar a partir de una mezcla de UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico preparados a una concentración de 0,5 mg mL ⁻¹ cada uno. La detección se realizó a 200 nm. (C): Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar del control de la reacción enzimática sin la adición del sustrato UDP-glucosa. La detección se realizó a 214 nm. (D): Electroferograma obtenido mediante Electroforesis Capilar de la mezcla de reacción pasados 30 min de contacto entre la enzima UDPG-deshidrogenasa con los sustratos (UDP-glucosa y oxígeno) y el coenzima (NADPH).....	104
Figura 44: (A) Representación directa de la cinética de saturación de UDPG-deshidrogenasa por UDP-glucosa. (B) Cálculo del valor de la K _m de la enzima UDPG-deshidrogenasa mediante el análisis de doble recíproca. (C) Representación de la relación entre la velocidad de reacción de la enzima UDPG-deshidrogenasa frente a diferentes tiempos con suministro de oxígeno.....	105
Figura 45: (A) Cinética de saturación de sustrato de la UDPG-deshidrogenasa con diferentes concentraciones del cofactor NADPH. (B) Cálculo del valor de la K _m para el cofactor NADPH mediante el análisis de doble recíproca. (C): Cálculo del coeficiente de interacción de la UDPG-deshidrogenasa con el NADPH	106
Figura 46: (A) Dependencia de la actividad de la enzima UDPG-deshidrogenasa sobre diferentes valores de pH utilizados en la mezcla de reacción. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas. (B) Dependencia de la actividad de la enzima UDOG-deshidrogenasa sobre diferentes valores de temperatura utilizados durante la reacción. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	107
Figura 47: (A) Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de <i>Xanthomonas albilineans</i> cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG o MMMG procedente de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas. (B) Variación del contenido proteico obtenido a partir de extractos libres de células después del cultivo. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	110
Figura 48: Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG+8-azaguanina (○) ó MMMG+8-azaguanina (Δ) y los controles sin 8-azaguanina (■) y con 8-azaguanina (□), procedentes de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.....	111
Figura 49: Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG+cloramfenicol (○) ó MMMG+cloramfenicol (Δ) y los controles sin cloramfenicol (■) y con cloramfenicol (□), procedentes de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.....	112
Figura 50 Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de <i>Xanthomonas albilineans</i> cultivada en medio Wilbrink líquido con 8-azaguanina (□), con cloramfenicol (□) ó sin ningún inhibidor (■). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.....	112

Figura 51: Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de <i>Xanthomonas albilineans</i> cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG (●), HMMG+piperina (○), MMMG (▲), MMMG+piperina (Δ), control (■) y control+piperina (□), procedente de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	113
Figura 52: Inhibición de la actividad proteasa bacteriana de las HMMG y MMMG aisladas a partir de segmentos de caña de azúcar no inoculados con la bacteria (ni) e inoculados (i). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	114
Figura 53: (A) Variación de la producción de los azúcares de las glicoproteínas HMMG (■) y MMMG (●) obtenidas a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos de caña de la variedad Barbados de 12 meses de edad sin inocular con <i>Xanthomonas albilineans</i> . Los valores obtenidos son la media de tres réplicas. (B) Variación de la producción de los azúcares de las glicoproteínas HMMG (■) y MMMG (●) obtenidas a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos de caña de la variedad Barbados de 12 meses de edad inoculados con <i>Xanthomonas albilineans</i> . Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	116
Figura 54: Variación del contenido de azúcares totales en las fracciones de polisacáridos insolubles en alcohol <i>iso</i> -propílico sin inocular (Δ), en las fracciones de glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG) sin inocular (▲) e inoculadas (■) y xantanos (□) aislados a partir de segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 de 12 meses de edad, en los días 1, 2, 3 y 4 del experimento. Los valores obtenidos son la media de 3 réplicas	118
Figura 55: Variación del contenido de azúcares totales en las fracciones de polisacáridos insolubles en alcohol <i>iso</i> -propílico sin inocular (Δ), en las fracciones de glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG) sin inocular (▲) e inoculadas (■) y xantanos (□) aislados a partir de segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 de 12 meses de edad, en los días 5, 6, 7, 8 y 9 del experimento. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	119
Figura 56: Variación de la producción de los azúcares de las glicoproteínas asociados a HMMG obtenidas a partir de jugo de caña de azúcar de 12 meses de edad tras ser precipitados con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% procedentes de segmentos de caña sin inocular con la bacteria <i>X. albilineans</i> (●) y a partir de segmentos de caña inoculados (■). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.....	120
Figura 57: Variación de los polisacáridos con peso molecular superior al de las HMMG extraídos con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% a partir de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> (■) y sin inocular con dicha bacteria (●). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	120
Figura 58: Variación del contenido de proteínas de las fracciones eluidas a través del sistema de columnas G-10 y G-50 conectadas entre sí de las fracciones obtenidas antes de la elución de las HMMG (desde el mL 58 al mL 70) precipitadas con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% procedentes de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos de tallos inoculados y sin inocular con <i>Xanthomonas albilineans</i> . Los valores obtenidos son la media de tres réplicas	121

Figura 59: (A) Electroferograma de las fracciones precipitadas con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3%, obtenidas a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos no inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> después de un día de tratamiento y eluidos a través de una sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las obtenidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis reveló dos picos diferentes absorbiendo a 200 nm con tiempos de migración absolutos de 5,87 min y 8,42 min. (B) Electroferograma de las fracciones extraídas con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% procedentes de jugo de caña de azúcar de segmentos no inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> después de un día de tratamiento y eluidos a través de una sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las obtenidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis reveló un único pico absorbiendo a 280 nm con un tiempo de migración absoluto de 8,42 min	123
Figura 60: (A) Electroferograma de las fracciones extraídas con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> pasado un día de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las eluidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis mostró dos picos diferentes absorbiendo a 200 nm con movilidades electroforéticas absolutas de 5,91 min y 9,0 min. (B) Electroferograma de las fracciones precipitadas con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> pasado un día de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las eluidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis no detectó ningún pico electroforético cuando se midió absorbancia a 280 nm.....	124
Figura 61: (A) Electroferograma de los azúcares liberados tras la hidrólisis ácida de los polisacáridos precipitados con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos de caña no inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> después de cinco días de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie eluidas entre los mL 58 al 70 previo a la elución de las HMMG. (B) Electroferograma de los azúcares liberados tras la hidrólisis ácida de los polisacáridos precipitados con alcohol <i>iso</i> -propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos de caña inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> después de cinco días de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie de las fracciones comprendidas entre los 58 mL y los 70 mL previos a la elución de las HMMG	125
Figura 62: Estimación del Brix obtenido a partir de concentraciones conocidas de sacarosa.....	127
Figura 63: (A) Cristalización parcial de la sacarosa a las 6 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña no inoculados. (B) Cristalización parcial de la sacarosa a las 6 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña inoculados con <i>Xanthomonas albilineans</i> . (C) Cristalización total de la sacarosa a las 24 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña no inoculados con la bacteria. (D) Cristalización total de la sacarosa a las 24 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña inoculados con <i>Xanthomonas albilineans</i>	128

Figura 64: Perfil de elución a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie de los xantanos y las HMMG en jugos obtenidos a partir de segmentos de caña de azúcar inoculados con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i>	129
Figura 65: (A y B) Cristalización parcial de la sacarosa a las 4 h a partir de una disolución saturada de sacarosa y adición de xantano. (C y D) Cristalización parcial de la sacarosa a las 6 h a partir de una disolución saturada de sacarosa con la adición de xantano. (E y F). Cristalización completa de la sacarosa a las 24 h a partir de una concentración saturada de sacarosa con la adición de xantano	130
Figura 66: (A), (B) y (C) Diferentes cristales de sacarosa obtenidos a las 24 h a partir de una solución concentrada de sacarosa sin la adición de xantano	131
Figura 67: Modelo de un cristal de sacarosa. Experimentos de rayos X y de difracción de neutrones revelan que la sacarosa cristaliza en el espacio con unas unidades de dimensión celular $a=10,8631 \text{ \AA}$, $b=8,7044 \text{ \AA}$, $c=7,7624 \text{ \AA}$, y un ángulo monoclinico, $\beta=102,938^\circ$	151

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Productos de procesamiento por cada 100 Tm de caña de azúcar (tallos limpios) (Casanova, 1982)	4
Tabla II: Algunos derivados de los azúcares de la caña	5
Tabla III: Principales países productores de caña de azúcar en el año 2005	6
Tabla IV: Usos prácticos del xantano en la industria de alimentos.	44
Tabla V: Componentes del medio Wilbrink sólido original para el cultivo de <i>Xanthomonas albilineans</i>	68
Tabla VI: pI y tiempo de migración expresado en minutos de las proteínas estándar utilizadas.....	73
Tabla VII: Proteínas estándar utilizadas con tamaño molecular y tiempo de migración, expresado en minutos, conocidos, para la determinación del tamaño molecular de la UDPG-deshidrogenasa.....	73
Tabla VIII: Componentes de los diferentes tubos de reacción para llevar a cabo el experimento de medida de la actividad proteasa.....	86
Tabla IX: Purificación de la enzima UDPG-deshidrogenasa de <i>Xanthomonas albilineans</i>	94
Tabla X: Análisis de la secuencia N-terminal de la enzima UDPG-deshidrogenasa deducida de acuerdo con la máxima concentración de un aminoácido particular obtenido tras sucesivas digestiones enzimáticas. El valor indicado en la segunda subcolumna para cada columna de orden indica el incremento relativo en la concentración de cada aminoácido respecto al obtenido en la digestión secuencial previa (valores 2/1, 3/2 etc).....	108
Tabla XI: Tabla XI: Estimación del Brix (% de sólidos solubles) de jugo de caña de azúcar extraído a partir de dos segmentos de tallo de caña procedentes de los entrenudos 1 y 2 inoculados (Tallo 1.1; Tallo 1.2; Tallo 2.1; Tallo 2.2) y sin inocular con la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> (Control 1 y Control 2), así como los valores obtenidos a partir de concentraciones conocidas de sacarosa	126

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR.

La caña de azúcar (*Saccharum spp.*) es uno de los cultivos más antiguos en el mundo. Se cree que empezó hace unos 3.000 años en la isla de Nueva Guinea. El azúcar y la caña de azúcar se mencionan en antiguos textos mitológicos y poéticos indios entre los años 100 y 800 a. C. y en textos legislativos entre 200 a. C. y 200 d. C. Probablemente se introdujo en China alrededor del año 100 a. C. (Mora, 1998). El proceso de obtención del azúcar se conoce en la India tan temprano como en el 3.000 a. C. Una leyenda local en las Islas de Salomón dice que los antepasados de la raza humana se generaron de un tallo de caña de azúcar. Una corona hecha de caña de azúcar se describe en el Atharvaveda, libro sagrado de los hindúes, escrito aproximadamente 800 a. C. El general griego Niarchos, quien acompañó a Alejandro el Grande a la India en el IV siglo a. C. cuenta de una caña que produjo "miel" sin la ayuda de las abejas.

Los egipcios de los tiempos faraónicos ya sabían extraer azúcar de la caña, pero de baja calidad. Con la expedición del rey Darío de Persia al valle del Indo (500 a.C.), los persas descubrieron la caña de azúcar y se mantuvieron como expertos durante siglos. Tras el prensado de la caña, se filtran los jugos para eliminar las impurezas que contienen, se someten a un proceso de evaporación para lograr la concentración adecuada, se cuece la miel resultante y se separan los cristales de azúcar de las mieles sobrantes. El primitivo proceso de transformación requería grandes cantidades de leña y produjo importantes deforestaciones. El término *trapiche* deriva del latín *trapettum*, denominación que se daba a los antiguos molinos de aceitunas (Ramos, 1995).

La caña de azúcar que actualmente se cultiva es un híbrido muy complejo de dos o más de las cinco especies del género *Saccharum*: *S. barberi*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense* y *S. spontaneum*. Muchas de estas especies sufrieron cruzamientos naturales, originando un género muy diverso.

Estudios realizados por investigadores sobre el origen de la caña de azúcar, reportan y concuerdan que *S. spontaneum*, *S. sinense* y *S. barberi* se desarrollaron en el área de Birmania, China, e India en el Asia meridional. Las formas relativamente jugosas de las dos últimas especies fueron utilizadas en los comienzos del cultivo y procesamiento de la caña de azúcar en la India y China.

Introducción

Cuando dichas especies se extendieron a otras regiones sufrieron de alguna forma diversos cruzamientos con otras gramíneas apareciendo, las especies *robustum* y *officinarum* en las islas del sureste de Indonesia, y en el área de Nueva Guinea respectivamente.

La caña se extendió de forma muy lenta, y llega al sur de España 773 d. C. y Sicilia (950 d. C.). La ruta hacia el oeste continuó y la caña llega a Madeira en 1420 y a las Islas Canarias (Humbert, 1974).

Cristobal Colón introdujo la caña en América, en su segundo viaje (1493), en la Isla de La Española, cañas que no prosperaron. Tan sólo en 1501 fueron introducidas plantas que sí crecieron. El éxito de las plantaciones de azúcar en Santo Domingo llevó a su cultivo a lo largo del Caribe y América del Sur (Martín y Lema, 1994).

En la actualidad, el cultivo de caña de azúcar se encuentra entre los diez primeros cultivos empleados para la alimentación humana. La caña de azúcar suministra, en primer lugar, sacarosa. También tiene aproximadamente 40 kg Tm⁻¹ de melaza (materia prima para la fabricación del ron) y también se pueden extraer unos 150 kg Tm⁻¹ de bagazo (residuo obtenido tras la extracción del jugo de la caña por cualquier medio, molino o prensa). Otros aprovechamientos de este cultivo son la obtención de componentes alimenticios para animales, bebidas gaseosas, levaduras, papel, repostería, vinazas, ceras, fibra absorbente, etc (López- Bellido, 2002).

Productos	Cantidad, Tm
Azúcar (96% Pol)	11
Bagazo (50% humedad)	27.5
Miel final (88% sólidos)	3.5
Cachaza (75% humedad)	2.5
Residuos agrícolas	20

Tabla I. Productos de procesamiento por cada 100 Tm de caña de azúcar (tallos limpios) (Casanova, 1982).

En la tabla que se muestra a continuación se hace mención a algunos productos derivados de la caña de azúcar.

Producto	Proceso		Utilización
	Químico	Biotechnológico	
Azúcar	X		Industria alimentaria
Glucosa	X		Ind. Alimentaria y farmacéutica
Fructosa	X		Ind. Alimentaria y farmacéutica
Alcohol etílico		X	Combustible, bebidas, ind.química
Levaduras		X	Piensos, Panadería, Bebidas
L-lisina		X	Piensos y alimentos
Ácido cítrico		X	Ind. Alimentaria y farmacéutica
Ácido láctico		X	Ind. Química y farmacéutica
Ácido Acético		X	Varias industrias
Ácido oxálico	X		Ind. Química y construcciones
Glutamato mono-Na		X	Industria alimentaria
Acetona y butanol		X	Industria química
Dextrana y xantano		X	Aglutinante, espesante
Sorbitol y manitol	X		Ind.alimentaria y farmacéutica

Tabla II. Algunos derivados de los azúcares de la caña

A continuación se representa en la siguiente tabla los principales países productores de caña de azúcar durante el año 2005.

1	<u>Brasil</u>	8.725.914	420.121.000
2	<u>India</u>	4.825.286	232.320.000
3	<u>China</u>	1.819.452	88.730.000
4	<u>Tailandia</u>	1.029.610	49.572.000
5	<u>Pakistán</u>	981.260	47.244.100
6	<u>México</u>	937.277	45.126.500
7	<u>Colombia</u>	827.669	39.849.240
8	<u>Australia</u>	794.369	38.246.000
9	<u>Filipinas</u>	643.870	31.000.000
10	<u>Estados Unidos de América</u>	535.948	25.803.960
11	<u>Indonesia</u>	529.635	25.500.000
12	<u>Sudáfrica</u>	451.230	21.725.100
13	<u>Argentina</u>	400.861	19.300.000
14	<u>Guatemala</u>	373.860	18.000.000
15	<u>Egipto</u>	339.278	16.335.000
16	<u>Viet Nam</u>	311.550	15.000.000
17	<u>Cuba</u>	259.625	12.500.000
18	<u>Venezuela, Rep Boliv de</u>	182.776	8.800.000
19	<u>Perú</u>	147.467	7.100.000
20	<u>Irán, Rep Islámica de</u>	135.005	6.500.000
	Sin símbolo = Cifra oficial F = Estimación de la FAO	* = Cifra extraoficial C = Cifra calculada	

■ La producción en Int \$1000 han sido calculados basados en precios internacionales 1999 -2001

Tabla III: Principales países productores de caña de azúcar en el año 2005.

1.2. ASPECTOS BOTÁNICOS: TAXONOMÍA, MORFOLOGÍA, CICLO BIOLÓGICO Y FISIOLOGÍA.

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum* L., tribu Andropogoneae y a la familia *Poaceae*. Esta tribu incluye especies de gramíneas de distribución tropical y subtropical entre las que se encuentran los géneros *Sorghum* y *Zea*. La taxonomía y filogenia de la caña de azúcar es complicada.

Las plantas de las seis especies que componen este género son el resultado de procesos de hibridación en los que participaron especies de los géneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* y *Sclerostachya*. El género *Saccharum* comprende seis especies: *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* y *S. sinense*. Posiblemente *S. officinarum* sea el resultado de procesos de hibridación entre *S. spontaneum*, *E. arundinaceus* y *M. sinensis* (Daniels y Roach, 1987; D'Hont et al., 1998).

En la actualidad existen multitud de cultivares comerciales de caña de azúcar, obtenidos mediante procesos de mejora genética con los que se intenta conseguir especies altamente productivas y resistentes a enfermedades (Bull y Glasziou, 1979). La caña de azúcar es una gramínea de distribución tropical que se desarrolla a partir de estacas (semilla vegetativa o reproducción asexual). La caña desarrolla dos tipos de tallos: el subterráneo y el aéreo; este último es el que almacena los azúcares. Los múltiples tallos aéreos están formados por una serie de nudos separados entre sí por entrenudos. Después de la germinación, la yema vegetativa terminal de cada tallo, da lugar a una serie de nudos cada uno de los cuales está constituido por una yema vegetativa, uno o más primordios radicales y un anillo de crecimiento también llamado meristemo intercalar.

Los entrenudos están constituidos principalmente por tejido vascular y las células del parénquima de reserva donde se almacena la sacarosa. El tallo se denomina primario, secundario, terciario, etc., si se origina de las yemas del material vegetativo original, del tallo primario, o de los tallos secundarios, respectivamente (Fig.1).

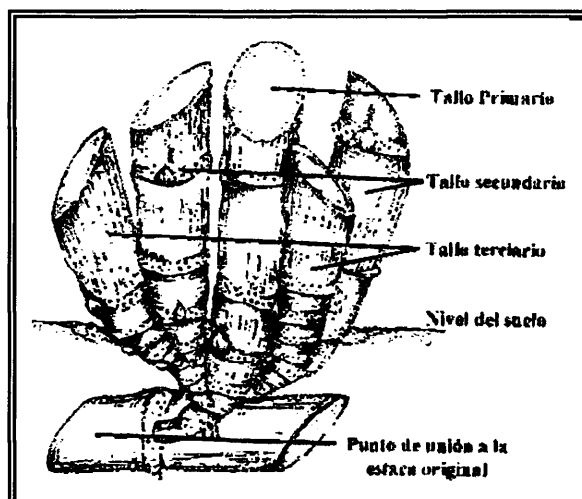


Figura 1. Diferenciación de los tallos en caña de azúcar. Tomado de Humbert, 1974.

Las hojas nacen de los nudos del tallo en forma alterna, formando dos hileras opuestas en un mismo plano. En el extremo del tallo está el meristemo apical

Introducción

formado por varios entrenudos de pequeño tamaño. Los tallos maduros están formados por siete hojas plegadas en forma de huso. La longitud de los entrenudos puede alcanzar un tamaño aproximado de 30 cm, dependiendo de las condiciones de crecimiento. El tamaño de los tallos puede llegar a ser de 3 m o más en condiciones normales de cultivo (Bull, 2000). Cada hoja esta formada por la lámina foliar y por la vaina o yagua. La unión entre estas dos partes se denomina lígula y en cada extremo de ésta existe una aurícula con pubescencia variable (**Fig. 2**).

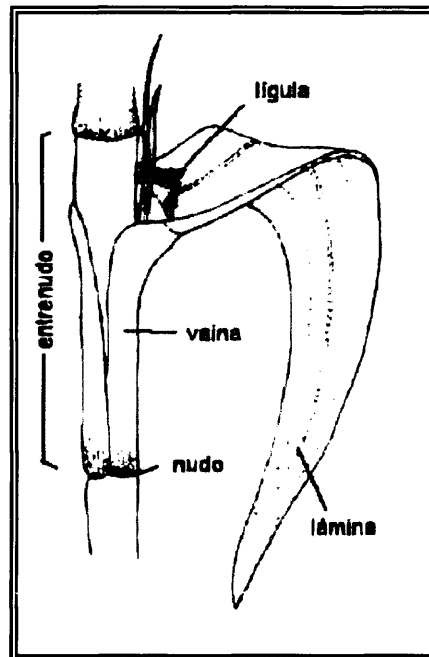


Figura 2: Partes estructurales de la hoja en caña de azúcar.

La lámina de la hoja en su cara abaxial es pubescente y glabra en su cara adaxial. La caña de azúcar es una planta C_4 , semejante a otras gramíneas tropicales y esto queda reflejado en la anatomía foliar. La base de la hoja conecta con el tallo a través del nudo formando la vaina que abraza al tallo y protege a su vez a los entrenudos de los que emergen las yemas. Un corte transversal de una sección de entrenudo revela la presencia de los haces vasculares rodeados por las células del parénquima con una gruesa capa epidérmica recubierta en su parte más externa por una cutícula de naturaleza cerosa. Como en la mayoría de las gramíneas, el sistema radicular está formado por las raíces adventicias delgadas y muy ramificadas y su periodo de vida dura hasta el momento en que aparece el segundo tipo de raíces llamadas permanentes.

Éstas últimas pueden ser superficiales, de sostén y profundas, sirviendo de anclaje para la planta y favoreciendo la absorción de agua en condiciones de estrés hídrico (**Fig.3**).

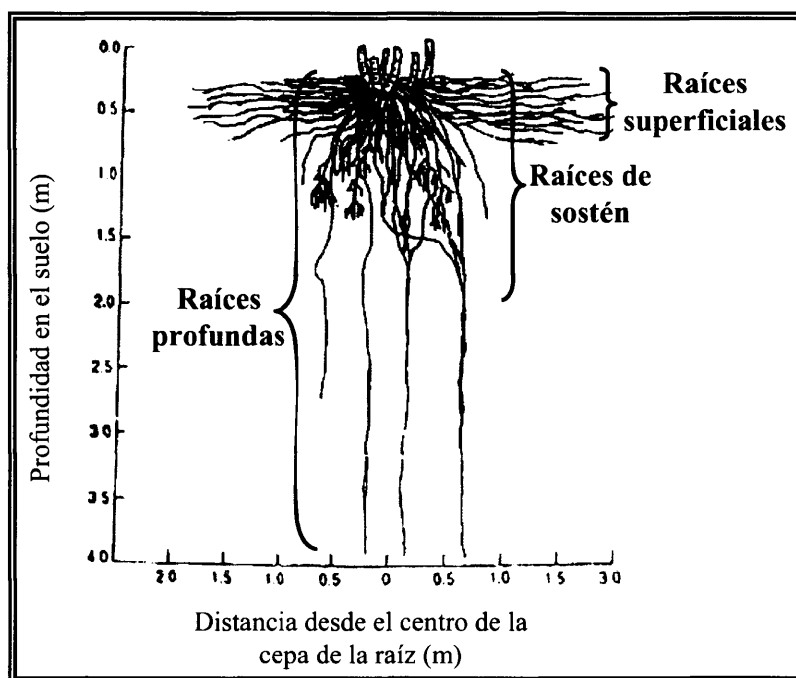


Figura 3: Distribución de las raíces en caña de azúcar.

La inflorescencia de la caña de azúcar es una panícula abierta en forma de espiga, cuya forma, grado de bifurcación y tamaño son específicos de la variedad. Está constituida por un eje principal con articulaciones donde están insertas las espiguillas, una frente a la otra. Cada espiguilla contiene una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas. Cada flor está rodeada por pubescencias largas que le dan a la inflorescencia un aspecto sedoso. En cada ovario hay un óvulo el cual una vez fertilizado, da origen al fruto o cariósipide. El fruto es de forma ovalada de 0.5 mm de ancho y 1.5 mm de largo, aproximadamente (**Fig. 4**).

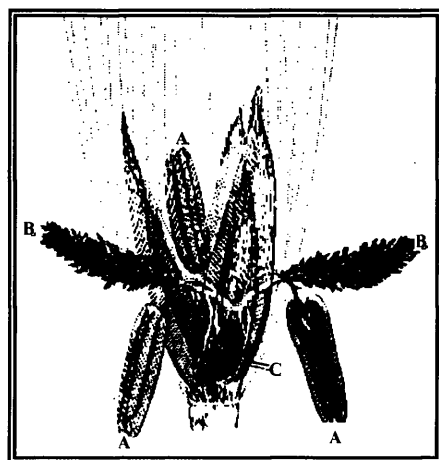


Figura 4: Partes de una inflorescencia en caña de azúcar. A) estambres, B) estigmas y C) ovarios.

No todas las variedades de caña de azúcar florecen con la misma intensidad, ya que hay factores genéticos que regulan la floración y factores ambientales que a su vez la inducen (Moore, 1987).

La fotosíntesis es un proceso fundamental que determina la productividad del 90% o más de la biomasa seca y, en el caso de la caña de azúcar, del 100% de los productos útiles: la sacarosa y el bagazo.

Como se ha mencionado anteriormente, la caña de azúcar pertenece al grupo de las plantas C_4 , en las cuales los primeros productos de la fotosíntesis tienen cadenas de cuatro átomos de carbono. Estas plantas se caracterizan por la alta tasa de fotosíntesis en las hojas individuales que se manifiesta en una alta producción de biomasa por hectárea y por año.

En las variedades de caña existen características que se relacionan con la tasa fotosintética neta (F_n). Así, existe una correlación negativa entre esta tasa y el ancho de la hoja, y positiva con el grosor y el peso específico (mg dm^{-1}) (Irvine, 1975). En las hojas normales de algunas variedades, la F_n no se correlaciona con el contenido de la clorofila, pero sí con la porosidad de la hoja.

En caña de azúcar, la F_n aumenta con la intensidad de la luz y muestra la característica de las plantas C_4 en el sentido de no alcanzar un nivel de saturación a altas intensidades de luz a tempranas edades de la planta. En las zonas tropicales, cuando la radiación solar es alta, generalmente en horas del mediodía, los rayos del sol inciden en forma vertical, lo cual permite una menor intensidad de la iluminación en plantas con hojas erectas, en comparación con plantas de hojas inclinadas. Lo anterior sugiere que la posición de la hoja puede contribuir a la obtención de mayores producciones de biomasa; sin embargo, en la caña este efecto es mínimo debido a que, como se mencionó antes, la fotosíntesis no se satura cuando la iluminación es alta. Sin embargo, aunque en las plantas jóvenes no se logra la saturación por la luz, en las plantas más viejas esto sí ocurre, lo que sugiere la posibilidad de alcanzar algunas ventajas con variedades de hojas más erectas, especialmente cuando éstas tienen una mayor edad.

La caña de azúcar es una planta C_4 de anatomía Kranz característica donde se diferencian dos tipos de células, las del mesófilo y las de la vaina. En plantas C_4 pertenecientes al subgrupo NADP-enzima málico (NADP-ME), como es el caso de la caña de azúcar, el oxalacetato (OAA) formado en el citosol de las células del mesófilo y transferido al cloroplasto donde se convierte en malato (MAL) por acción de la NADP-malatodeshidrogenasa, con consumo de poder reductor. El MAL generado, a favor de gradiente, puede ser transportado directamente a las células de la vaina.

Según Stitt *et al.*, (1987), el PGA que difunde desde células de la vaina hasta las del mesófilo se emplea, preferentemente, para la síntesis de sacarosa. Los cloroplastos de las células del mesófilo contienen las enzimas de la fase reductora del Ciclo de Calvin y pueden llevar a cabo la reducción del PGA Y DHAP. El piruvato (PA) producido por descarboxilación del MAL es transportado hacia las células del mesófilo para completar el ciclo y mantener el balance de carbono de la hoja. El PA en los cloroplastos de las células del mesófilo se convierte en fosfoenolpiruvato (PEP) por acción de la piruvato fosfatodiquinasa (Ver esquema).



La sacarosa es un disacárido no reductor que resulta de la unión fructosa-glucosa por sus carbonos 2 y 1, respectivamente. Es uno de los principales productos resultantes de la fijación fotosintética de CO₂ en las hojas, el compuesto principal para el transporte a larga distancia de hidratos de carbono en el floema y además, en caña de azúcar, es la forma de almacenamiento de los productos de la fotosíntesis. La síntesis de sacarosa se efectúa en el citosol de las células de la vaina y no en los cloroplastos, donde se lleva a cabo el Ciclo de Calvin. La glucosa y la fructosa libres no son precursores importantes de la sacarosa, pero sí lo son las formas fosforiladas de éstas. Las triosas fosforiladas (3-fosfogliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato), productos de tres carbonos resultantes de la fijación del CO₂ por el Ciclo de Calvin en el cloroplasto, se exportan al citosol, en donde se utilizan principalmente para sintetizar sacarosa, aunque también pueden originar ácidos orgánicos y aminoácidos.

Este transporte es realizado por una proteína transportadora situada en la membrana externa del cloroplasto, la cual intercambia una molécula de ortofosfato por una de triosa fosfato. Dos moléculas de triosas fosfato se unen para formar fructosa-1,6-difosfato. La cual se defosforila para originar fructosa-6-fosfato, que se convierte rápidamente en otras hexosas fosforiladas, tales como glucosa-6-fosfato mediante la acción de una fosfoglucosa isomerasa y glucosa-1-fosfato, reacción catalizada por la enzima fosfoglucosa mutasa. Estas hexosas se activan mediante la unión de nucleótidos. El producto de la unión que se forma con más frecuencia es el uridín difosfato-glucosa (UDP-glucosa), formado por la reacción de uridín trifosfato (UTP) y de glucosa-1-fosfato. Finalmente, el disacárido de sacarosa sería el resultado de la desfosforilación en la unión de una molécula de UDP-glucosa y fructosa-6-fosfato, en reacciones catalizadas por la sacosa sintasa y sacarosa fosfatasa.

La acumulación de sacarosa en el floema se realiza mediante incorporación en el complejo tubo criboso-célula de compañía desde el apoplasto. En las especies que transportan sacarosa en los tubos cribosos, la incorporación de ésta a los mismos implica dos procesos de transporte a través de membranas: una liberación inicial al apoplasto desde el simplasto del mesófilo, seguida de una incorporación en el complejo tubo criboso célula de compañía, mediante un proceso de cotransporte con H⁺ altamente selectivo. El mecanismo de liberación de sacarosa al apoplasto no está inequívocamente caracterizado aunque se postula un cotransporte con K⁺ a través del plasmalema (Huber y Moreland, 1981). La descarga del floema está determinada por la utilización o compartimentación de los carbohidratos en los sumideros y parecen existir distintos mecanismos relacionados con la naturaleza del sumidero

(Escrich, 1989). La descarga apoplástica es aparentemente pasiva aunque puede implicar un transporte mediado (Alóni *et al.*, 1986).

En la caña de azúcar, la acumulación de sacarosa desde el apoplasto tiene lugar después de su hidrólisis por una invertasa de pared, siendo acumuladas en este caso las hexosas resultantes. La sacarosa es posteriormente resintetizada a partir de las hexosas formadas en el espacio libre.

Tampoco puede descartarse la existencia de un mecanismo de cotransporte sacarosa/ H^+ . La acumulación de sacarosa en la vacuola parece tener lugar por un mecanismo de antitransporte sacarosa/ H^+ . La energía para este proceso sería suministrada por una ATPasa localizada en el tonoplasto que translocaría protones hacia el interior de la vacuola. Una última posibilidad es que la sacarosa pase directamente desde el elemento criboso a las células del parénquima vascular del órgano consumidor a través de plasmodesmos (Barceló *et al.*, 2001)

La utilización de sacarosa en los procesos de crecimiento o en la síntesis de polisacáridos de reserva generaría el gradiente de concentración favorable para su descarga.

Con independencia del proceso de descarga, éste provoca la salida de agua del tubo criboso y una disminución de la turgencia, generando de este modo el gradiente de presión responsable del movimiento de la disolución en el interior del mismo.

1.3. MADURACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR.

La maduración de la caña de azúcar se describe como la senescencia intermedia entre el auge del crecimiento y la muerte de la planta, estableciéndose dos fases en dicho proceso. La primera fase termina cuando las hojas envejecidas se desprenden del tallo, y la segunda fase comprende la acumulación de la sacarosa en los entrenudos que ya terminaron su elongación.

Al comienzo de la primera fase se encuentran entrenudos con altas concentraciones de agua, nitrógeno, auxinas, enzimas, azúcares reductores y metabolitos de la fotosíntesis y de la respiración. Las células de almacenamiento son grandes y con paredes celulares delgadas. Se diferencian de forma acelerada nuevos tejidos, raíces y hojas. Gradualmente, los entrenudos completan su elongación y engrosamiento, la pared de las células de almacenamiento se fortalece, ocurre una deshidratación de los tejidos, aumenta la acumulación y retención de sacarosa y disminuye la velocidad de crecimiento.

La segunda fase de la maduración, es decir, la acumulación masiva de la sacarosa, está regulada por factores genéticos (variedad de la caña) y factores externos tales como el suministro de nutrientes, la humedad, el clima, la edad de la caña y el manejo del cultivo (prácticas agronómicas). Internamente, esta segunda fase de la maduración está controlada por invertasas. Según el desarrollo fisiológico de la planta, si ésta se encuentra en condiciones adecuadas nutricionales y edafoclimáticas, el proceso de maduración se llevará a cabo de una forma natural en correspondencia con su ontogenia.

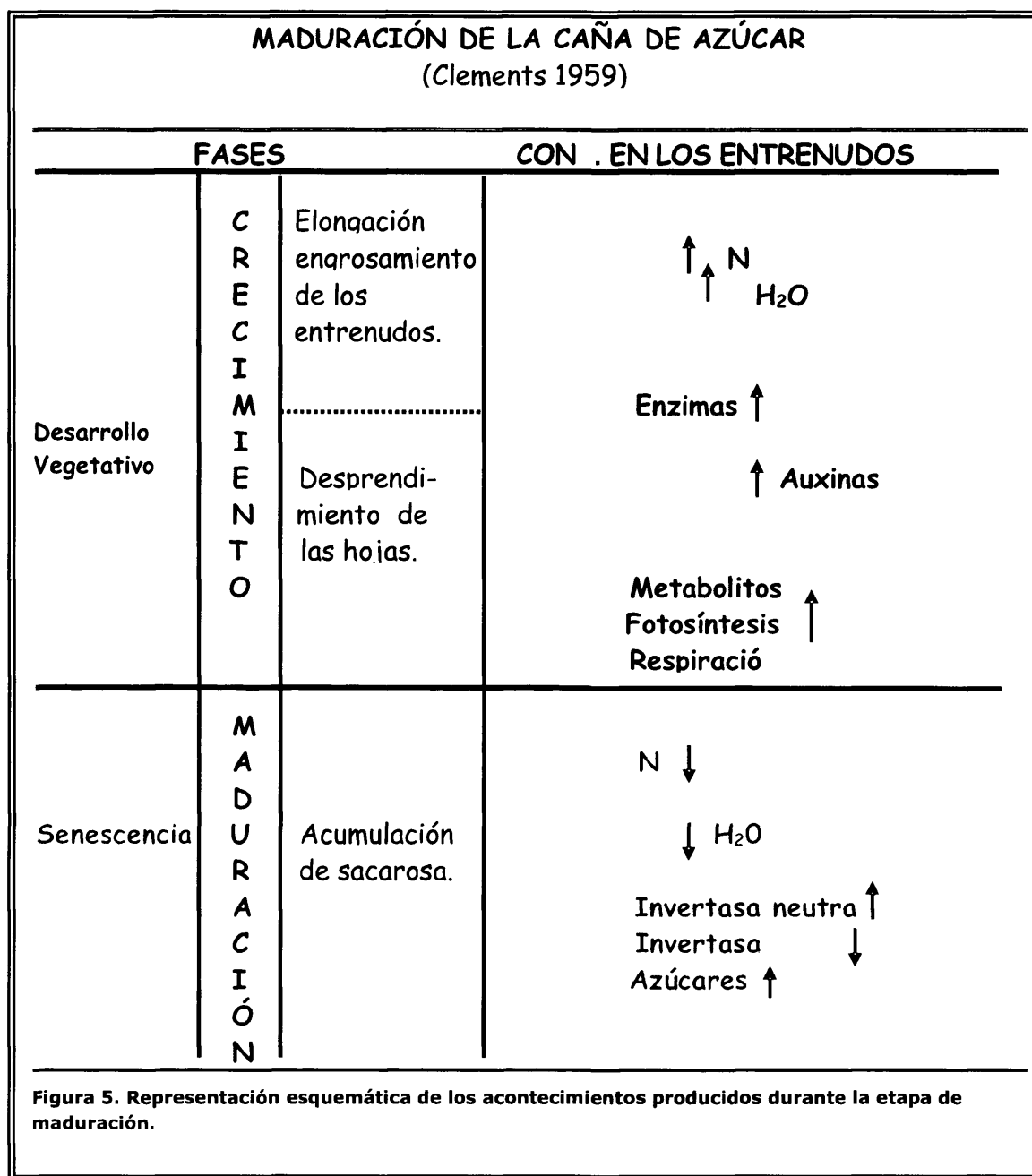
El manejo adecuado del cultivo de la caña de azúcar se integrará al proceso de maduración con el objetivo de inducir, sincronizar e incrementar la concentración de sacarosa (**Fig.5**).

1.3.1 Condiciones de maduración de la caña de azúcar.

La maduración de la caña de azúcar, entendida como el proceso de acumulación de sacarosa en los tejidos de los entrenudos, está controlada por la conjunción de factores genéticos, climáticos, sanitarios, fisiológicos, agronómicos, etc. Existe información relativa a la influencia genética sobre el rendimiento industrial de la caña de azúcar. La habilidad para concentrar sacarosa es diferente según la variedad de caña (**Fig.5**). Con una misma variedad se obtienen diferentes niveles de maduración en distintas condiciones de clima, suelo y época del año. Las variedades de caña de azúcar responden diferencialmente a un mismo estímulo madurador.

La maduración no va paralela con la edad. Si las concentraciones de nitrógeno y agua se mantienen abundantes, la planta nunca madura. Nickell y Tanimoto, en 1968, demostraron que el exceso de nitrógeno disponible en época de cosecha es la principal causa de los bajos contenidos de sacarosa en los jugos extraídos de caña.

Las invertasas juegan un papel determinante en la etapa de maduración de la caña de azúcar. Esto se debe a la función de estas enzimas en el mecanismo celular, ya que dirigen la utilización de los azúcares hacia el crecimiento o hacia el almacenamiento (Sacher *et al.*, 1963).



La sacarosa se sintetiza en el citoplasma de las células acompañantes del floema y en menor proporción en las células de la vaina a partir del conjunto de hexosas-P producido en la fotosíntesis. Parte de la glucosa-6-P producida es transformada en glucosa-1-P por acción de una fosfoglucomutasa.

La glucosa es entonces transferida sobre una molécula de UTP, por acción de una UDP glucosa pirofosforilasa, para producir pirofosfato y UDP glucosa, que transfiere entonces su resto glucosa a una molécula de fructosa-6-P para producir sacarosa-6-P.

La reacción está catalizada por una sacarosa-P sintasa. El disacárido fosfato es sustrato de una sacarosa-P fosfatasa que libera sacarosa y P_i en el citoplasma (Dennis y Blakeley, 2000).

Para la maduración, es necesario mantener una óptima actividad enzimática. Hatch *et al.*, en 1963, señalan la existencia de dos invertasas solubles: una ácida, localizada en el apoplasto y la vacuola de las células de la planta. Su función es hidrolizar y transportar la sacarosa desde las hojas hasta los tallos durante el crecimiento. La mayor actividad de esta enzima, cuyo funcionamiento se da con un pH óptimo entre 5 y 5,5, ocurre en el periodo de crecimiento y disminuye en la etapa de maduración, encontrándose en el espacio externo de las células parenquimatosas (Alexander, 1973). En estos espacios, la sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructosa que son entonces transferidas al espacio metabólico de las células parenquimatosas. Allí son entonces fosforiladas para ser usadas en la resíntesis de sacarosa, que es entonces llevada al compartimento de almacenaje (Sacher *et al.*, 1963). Transitoriamente, la acumulación de glucosa en el citoplasma podría dar lugar a una represión catabólica de la invertasa neutra (**Fig.6**).

Esta invertasa, por su parte, presenta su máxima actividad a un pH de 7, y se localiza en el citoplasma de los tejidos maduros, donde se emplea en regular la cantidad de sacarosa almacenada. Su máxima actividad se presenta en el periodo de maduración (Hatch *et al.*, 1963; Batta y Singh, 1986).

Hatch y Glasziou (1963) demostraron que la invertasa ácida presenta variaciones con el clima. Además, observaron una correlación entre el crecimiento y la actividad de estas enzimas y comprobaron que, con el aumento de la temperatura, aumenta la velocidad de alargamiento y la actividad de la invertasa ácida.

Los descensos de temperatura en los tejidos maduros favorecen la actividad de la invertasa neutra y esto trae consigo un aumento en la concentración de azúcares. Sin embargo, los descensos de temperatura en los tejidos inmaduros disminuyen la actividad enzimática de la invertasa ácida y, como consecuencia, se produce una disminución en la velocidad de crecimiento del tejido.

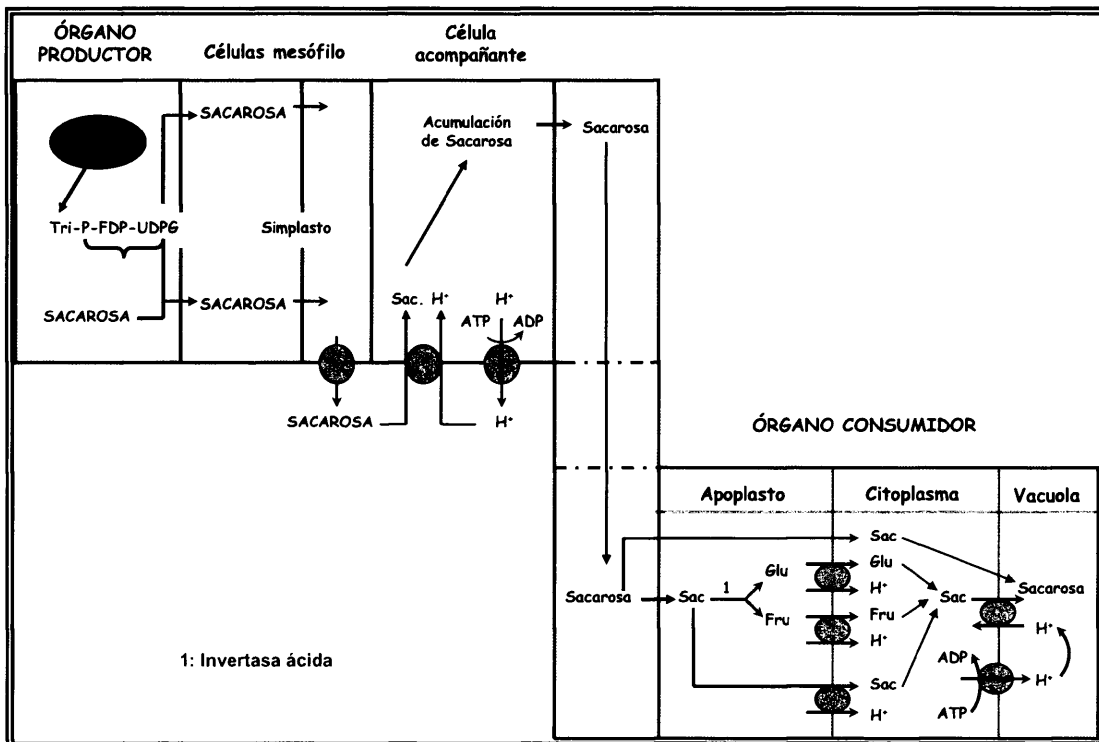


Figura 6: Carga y descarga del floema. Posible mecanismo de transporte de sacarosa entre el órgano productor y el órgano consumidor.

1.4. PRODUCCIÓN DE HETEROFRACTANOS EN CAÑA DE AZÚCAR.

El metabolismo normal del conjunto de hexosas-P, producido en la fotosíntesis, implica su conversión en sacarosa para ser posteriormente translocada. Esto es importante en especial en las plantas azucareras, en las que los parénquimas de tallos u órganos subterráneos acumulan una gran cantidad de sacarosa en su maduración, hablándose entonces de calidad de los jugos.

De una manera simplista, aunque válida, la calidad del jugo de caña de azúcar, por ejemplo, depende solamente de que tenga un alto contenido en sacarosa y un bajo contenido en azúcares reductores. De acuerdo con Amaral *et al.* (1971), la maduración se logra con niveles de reductores muy por debajo del 1%.

Sin embargo, algunos autores han prestado atención a algunos de los compuestos que, además de sacarosa y reductores, se encuentran disueltos o en suspensión en el jugo de caña, tratando de relacionar su contenido con la maduración. Por ejemplo, se sabe que el contenido en macromoléculas coloidales está representado

por una fracción que no rebasa el 0,3% (Imrie y Tilbury, 1972) y comprende fundamentalmente proteínas y polisacáridos hidrosolubles. Estos últimos influyen fuertemente a lo largo de todo el proceso industrial de extracción de sacarosa, produciendo una excesiva viscosidad de los jugos que entorpece la eficiencia económica del proceso (Honig, 1969).

El metabolismo normal de los carbohidratos en caña de azúcar produce un conjunto heterogéneo de polisacáridos solubles. Este conjunto incluye arabinogalactanos (Roberts *et al.*, 1976), polímeros semejantes al almidón (Covacevich y Richards, 1977 a,b), y β -1,4-glucanos (Roberts *et al.*, 1985). Fructanos solubles de masa molecular superior a 10 kDa han sido encontrados en jugos de caña (Legaz *et al.*, 1990). Los fructanos son la forma principal de carbohidratos de almacenamiento en plantas C_3 de pastizales templados (Meier y Reid, 1982; Pontis, 1990). No obstante, el origen de los fructanos en plantas C_4 , como es la caña de azúcar, permanece desconocido.

Rodríguez *et al.* (1985a), estudiando el comportamiento de las macromoléculas del jugo durante la etapa de maduración de la caña, han encontrado que el contenido de aquellas incrementa con la edad hasta que la caña alcanza la madurez óptima y disminuye posteriormente en paralelo a la disminución de la fracción proteica. Sin embargo, esta disminución coincide con un notable aumento del contenido de polisacáridos solubles, aunque esto no se manifiesta en todas las variedades estudiadas.

Las cañas llamadas de ciclo corto, la variedad Jaronú 60-5, por ejemplo, muestran un contenido estable de polisacáridos solubles de alto peso molecular (**HMMC**) durante su desarrollo, mientras que polisacáridos de mediano peso molecular (**MMMC**) incrementan lentamente hasta los 12 meses de vida, tiempo de maduración en el que coincide la menor concentración de azúcares reductores con la mayor concentración de sacarosa, y después de este tiempo incrementan rápidamente. Por el contrario, las de ciclo largo, Cuba 374 72 y Barbados, muestran un contenido alto y constante de MMMC incluso después de la maduración, que suele darse alrededor de los 14 meses. No se han encontrado efectos claros de la fertilización sobre el contenido de macromoléculas del jugo de caña (Rodríguez *et al.*, 1985b) y existen evidencias de que una de las causas de la proliferación de macromoléculas en los jugos de cañas cortadas es una reacción de cicatrización frente a los traumatismos causados por las heridas (Valdés y Rodríguez, 1982).

1.4.1. Naturaleza de los polisacáridos solubles de caña de azúcar.

Las dos formas mayoritarias de los diferentes polisacáridos solubles de jugo de caña, aisladas en la forma descrita, han sido sujeto de otros análisis. HMMC aislados de jugos de tallos de 12 meses de vida fueron sometidos a hidrólisis enzimática, usando alternativamente glicosidasa purificada de caña, invertasa comercial o una mezcla de ambas enzimas. La enzima glicosidasa hidroliza parcialmente HMMC durante el tiempo de reacción, liberando fructosa y galactitol como productos de hidrólisis, mientras que el polisacárido se muestra resistente a hidrólisis por invertasa. Sólo cuando se añade sacarosa 27 μM a la mezcla de reacción, la invertasa es capaz de hidrolizar parcialmente HMMC con liberación exclusivamente de fructosa. Este efecto muestra ser aditivo al de la glicosidasa por sí sola (De Armas *et al.*, 1992 a). La hidrólisis de estos HMMC ha sido también llevada a cabo incubando la misma cantidad de HMMC con HCl 6N durante 14 h a 60°C o usando una preparación comercial de invertasa durante 14h a 45°C en presencia de sacarosa 27 μM a pH 4,5. De esta manera, fructosa y galactitol fueron identificados como los únicos productos de la hidrólisis ácida.

El esqueleto de HMMC hidrolizado por invertasa representa alrededor del 44% del heterofructano total. Ya que la invertasa es capaz de hidrolizar enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ en polisacáridos, puede concluirse que los HMMC consisten en un esqueleto principal de fructosa en uniones $\beta(2\rightarrow1)$, hidrolizado por invertasa, mientras que el enlace éter entre fructosa y galactitol es inaccesible a la enzima, pero sensible a hidrólisis ácida y a la glicosidasa de la propia caña. Otros oligofructanos, tales como los acumulados por *Lolium*, son también hidrolizados por invertasa. Resultados semejantes fueron obtenidos mediante hidrólisis enzimática combinada de MMMC aislados del mismo jugo.

En las mezclas de reacción se incluía Mn^{2+} , a dos diferentes concentraciones, como cofactor del sistema glicosidasa. Dado que el sistema glicosidasa requiere Mn^{2+} , no hay hidrólisis detectable de MMMC en ausencia del catión. No obstante, la hidrólisis por invertasa muestra ser independiente de este catión. La hidrólisis llevada a cabo por las dos enzimas fue aditiva cuando la concentración de Mn^{2+} en mezcla de reacción fue tres veces inferior a la descrita como óptima para llevar a cabo la hidrólisis de heterofructanos (Martínez *et al.*, 1990 b), pero el efecto de la invertasa no fue aditivo al de la glicosidasa cuando esta última enzima tenía a su disposición la concentración óptima de cofactor.

1.4.2. Origen de los polisacáridos solubles.

Ya se ha dicho anteriormente que la concentración de MMMC incrementa notablemente con la edad de la caña, sobre todo si ésta es de ciclo corto, mientras que la concentración de HMMC incrementa mucho más lentamente. También se ha dicho que la concentración de polisacáridos solubles parece ser una función del número de heridas que la caña sufre durante su cortado. Es claro que el metabolismo de azúcares y polisacáridos, en las condiciones experimentales descritas, puede verse notablemente afectado por bacterias contaminantes, que utilicen los hidratos de carbono de la caña como sustrato de crecimiento. De hecho, la hidrólisis enzimática de polisacáridos de caña ha sido atribuida al crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, que aumenta la cantidad de reductores presentes e induce la aparición de metabolitos de origen típicamente fermentativo, como lactato y manitol (Bruijin, 1970).

Sin embargo, los microorganismos presentes en los jugos mueren al ser incapaces de crecer en ambos polisacáridos, lo que claramente indica su incapacidad para utilizarlos como sustratos de crecimiento. Por tanto, el metabolismo de HMMC y MMMC, identificados como heterofructanos, parece ser función de la edad, de la agresión mecánica o del deterioro, excluyéndose del mismo toda acción microbiana, que podría afectar, eso sí, la estabilidad de otros polisacáridos, sean homoglicanos o arabinogalactanos. Esta actividad glicosidasa ha sido utilizada para avanzar un paso más en la elucidación del origen de HMMC y MMMC en caña de azúcar. Cuando una suspensión de paredes celulares de células parenquimatosas del tallo de caña era incubada con glicosidasa a 30°C durante 9h, ocurre hidrólisis de alguna fracción de pared.

La cantidad de azúcares reductores liberados es similar a la obtenida en un control de suspensión de paredes en citrato, pero se producen algunos polímeros durante la incubación. La filtración por la serie de Sephadex indica que las fracciones HMMC en el sobrenadante de las mezclas de incubación son mucho más abundantes tras mantener las paredes en contacto con glicosidasa que en los controles.

Estos polímeros tenían una conducta muy semejante en SE-HPLC a la encontrada para HMMC convencionales. Por ello, podría concluirse que, tras herida o post-maduración de los tallos, la glicosidasa soluble citoplásmica es capaz de hidrolizar parcialmente un polímero de pared, lo que libera HMMC y MMMC al citoplasma (Martínez *et al.*, 1990 a).

1.4.3. Los heterofructanos de caña como mitad polisacáridica de glicoproteínas.

Un paso más en el análisis estructural de estas macromoléculas fue descrito por Legaz *et al.* (1995) al analizar la homogeneidad de HMMC y MMMC por HPLC usando columnas Zorbax GF-450 y Zorbax GF-250 en serie. Mientras HMMC parecía estar compuesto al menos por dos diferentes polímeros con tiempos de retención de 16,5 min y 24,5 min, respectivamente, la fracción MMMC se resolvía en un único pico de tiempo de retención 2,45 min. Esto implicaba, como era por otra parte lógico, que el Sephadex G50, usado rutinariamente en la separación de HMMC y MMMC, no era capaz de discriminar entre las dos categorías de macromoléculas, y que HMMC eluido de dicho Sephadex iba normalmente contaminado por una pequeña proporción de MMMC.

Los espectros de absorción de HMMC y MMMC, separados por SE-HPLC, mostraron un máximo inusual para polisacáridos, a 275 nm para HMMC y 271 nm para MMMC, mostrando esta última macromolécula un máximo secundario a 246 nm. Excitando ambas fracciones con una luz monocromática de 275 nm, HMMC emitía fluorescencia con un máximo a 334-336 nm mientras que MMMC emitía con un máximo de fluorescencia a 347 nm.

Empleando una luz de excitación de 210 nm, HMMC emitía fluorescencia con un máximo principal a 422 nm, un máximo secundario a 296 nm y un hombro a 332 nm. MMMC, a su vez, emitía fluorescencia con un máximo localizado a 296-297 nm. Esta conducta óptica era impropia de un polisacárido, ya que éstos solo emiten fluorescencia en estados de máxima oxidación, circunstancia completamente opuesta a la naturaleza tanto de HMMC como de MMMC, dado que contienen altas proporciones de galactitol, el poliacohol reducido de la galactosa. Los máximos de fluorescencia estimados podrían deberse a la presencia de triptófano, con máximos de emisión a 346-347 nm para una luz de excitación de 275 nm.

El desplazamiento de este máximo a 334-336 nm estimado para HMMC podría implicar que los restos triptófano en HMMC ocupan una posición extremadamente lipofílica mientras que se encuentran más altamente expuestos en MMMC. A su vez, la existencia de tirosina vendría determinada por máximos de emisión de fluorescencia a 296-302 nm cuando se excita con luz de 210 nm de longitud de onda.

Además, su movilidad en Electroforesis Capilar, que secundariamente revelaba microheterogeneidad para cada uno de los HMMC y MMMC previamente aislados por SE-HPLC, confirmaba su naturaleza glicoproteica (Legaz *et al.*, 1998).

Por tanto, y a partir de este punto, tanto HMMC como MMMC, deben ser consideradas como glicoproteínas capaces por tanto de llevar a cabo funciones fisiológicas propias de su naturaleza, denominándose a partir de este momento HMMG y MMMG respectivamente. Por analogía con los sistemas descritos hasta ahora en otras plantas, se ha estudiado la participación de estas fracciones glicoproteicas (HMMG y MMMG) en el reconocimiento de un endofito fijador de nitrógeno, como es *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Ambas fracciones, marcadas con fluoresceína, resultaron ser capaces de unirse a paredes celulares de la bacteria, propiedad que trae consigo una agregación celular (reclutamiento) en medios líquidos suplementados con tales glicoproteínas. El reclutamiento no modificaba la velocidad de crecimiento del cultivo ni se llevaba a cabo entre bacterias epifíticas naturales, como es el caso de *Leuconostoc mesenteroides* o *Erwinia amylovora*, bacterias que se desarrollan en el medio acuoso que forman las vainas foliares en su punto de inserción (Legaz *et al.*, 2000). Ambas fracciones glicoproteicas son microheterogéneas, contando con componentes aniónicos y catiónicos (Legaz *et al.*, 1998). Las dos fracciones glicoproteicas (HMMG y MMMG) ligadas a la pared celular de la bacteria pudieron ser desorbidas con sacarosa, lo cual está de acuerdo con la naturaleza fructan- β -1,2 de la mitad glicídica de ambas fracciones glicoproteicas. Sobre esta base, se ha elaborado una hipótesis acerca de la capacidad de la caña para reconocer endofitos compatibles y discriminarlos de los incompatibles o, incluso, de patógenos (Legaz *et al.*, 2000) y finalmente se han podido caracterizar receptores específicos en la pared celular de *G. diazotrophicus* para HMMG y MMMG (Blanco *et al.*, 2005 a), así como en las paredes celulares de la bacteria patógena, *Xanthomonas albilineans* (Blanco *et al.*, 2006).

Con respecto al papel fisiológico que esta interacción HMMG/MMMG-ligando pueda tener, recientemente se ha comprobado que las teliosporas de *Ustilago scitaminea*, un hongo patógeno de caña y otras gramíneas, sufren agregación celular en presencia de las fracciones glicoproteicas HMMG y MMMG, correlacionándose este reclutamiento con la adhesión de las glicoproteínas marcadas con fluoresceína a las paredes celulares de las esporas. Este ligamiento de las glicoproteínas sobre hipotéticos ligandos no modifica la velocidad de germinación de las teliosporas pero sí inhibe el desarrollo posterior del micelio (Fontaniella *et al.*, 2002 a) en variedades moderadamente resistentes o inhibe la germinación cuando dichas glicoproteínas han sido producidas por variedades altamente resistentes, al impedir la organización del citoesqueleto de la espora que marca el punto de emergencia del tubo germinativo (Millanes *et al.*, 2005).

El papel de las glicoproteínas de caña en el reclutamiento celular, adhesión a la superficie de la planta huésped e inhibición de la germinación y del crecimiento de microorganismos fitopatógenos está de acuerdo con la particulación de dichas glicoproteínas en paredes celulares del vegetal. Podría pensarse entonces que los mecanismos de deterioro provocan una emigración de los sistemas glucosidasa a dichas paredes, produciéndose entonces la hidrólisis parcial de la mitad glicídica de dichas glicoproteínas que podría ser entonces recuperada como polisacáridos solubles en los jugos de la planta, según se muestra en el esquema de la (Fig.7).

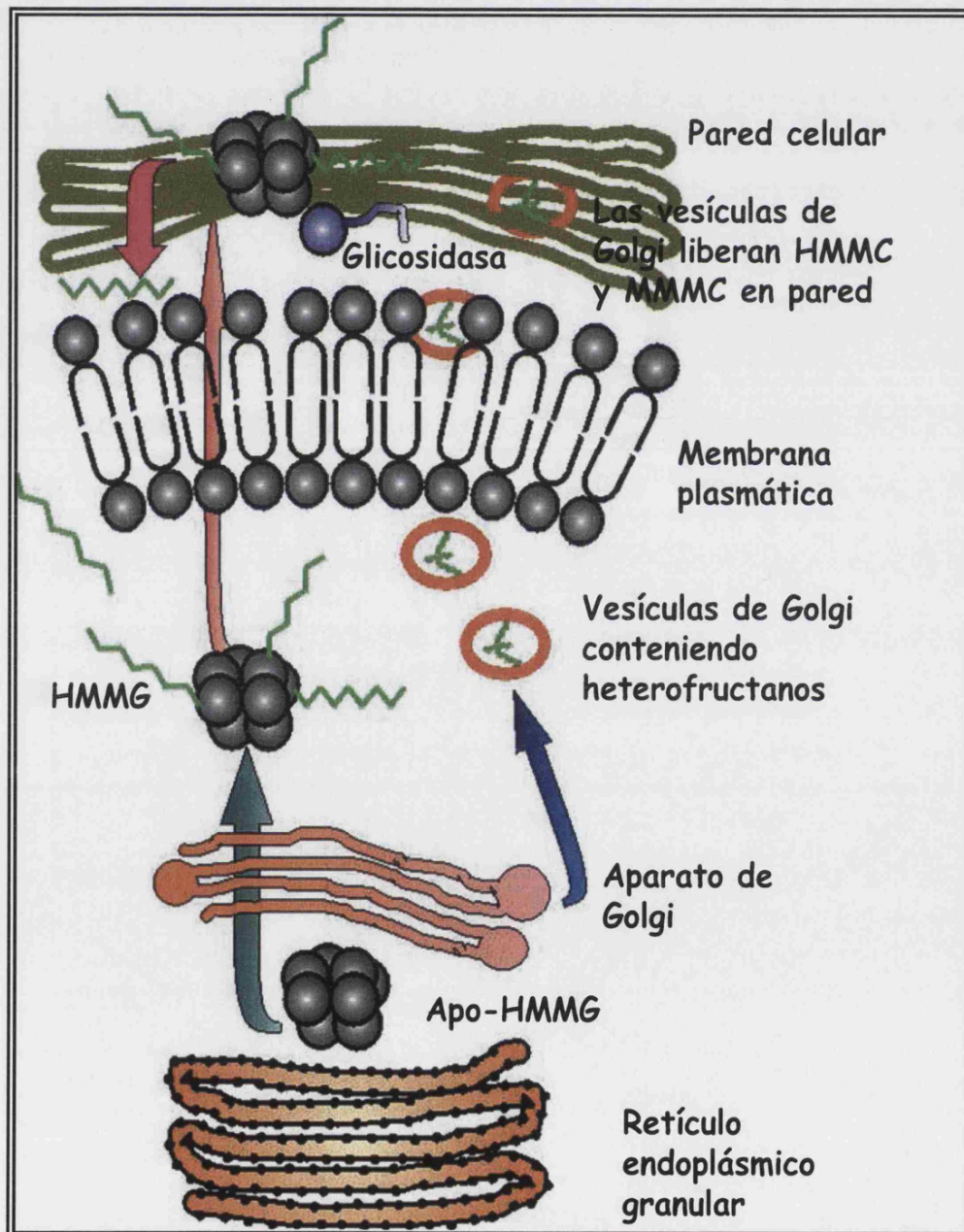


Figura 7: Síntesis y transporte de glicoproteínas a la pared celular.

1.4.4. Alteración producida en el proceso de cristalización de la sacarosa originado por las glicoproteínas de caña de azúcar.

Altos contenidos en HMMG y MMMG en jugos de caña de azúcar producen pérdidas en la recuperación de la sacarosa durante la producción industrial de azúcar y cambios en las conductas de cristalización del disacárido. La sacarosa, a partir de disoluciones saturadas, forma cristales del sistema monoclínico esfenoidal que se agregan en núcleos de cristalización de forma estrellada. La adición de HMMG obtenido de plantas sanas a disoluciones de sacarosa retardaba la aparición de cristales y aunque dichos cristales eran tan largos como los que aparecían en disoluciones no modificadas, eran mucho más finos (de Armas, *et al.*, 1992 b). Los núcleos estrellados se producían de forma incompleta cuando la recristalización se llevaba a cabo en presencia de HMMG obtenidas de plantas enfermas de escaldadura foliar y, además, aparecían cristales prismáticos y algunos de forma irregular. Incluyendo MMMG en las disoluciones, se obtuvieron resultados similares aunque la falta de núcleos estrellados fue constante en presencia de glicoproteínas obtenidas de plantas escaldadas (Fontaniella *et al.*, 2003 a). Estas diferencias parecían ser debidas a cambios estructurales de HMMG y MMMG antes que al incremento en la concentración de glicoproteínas inducido por la enfermedad (**Fig. 8**).

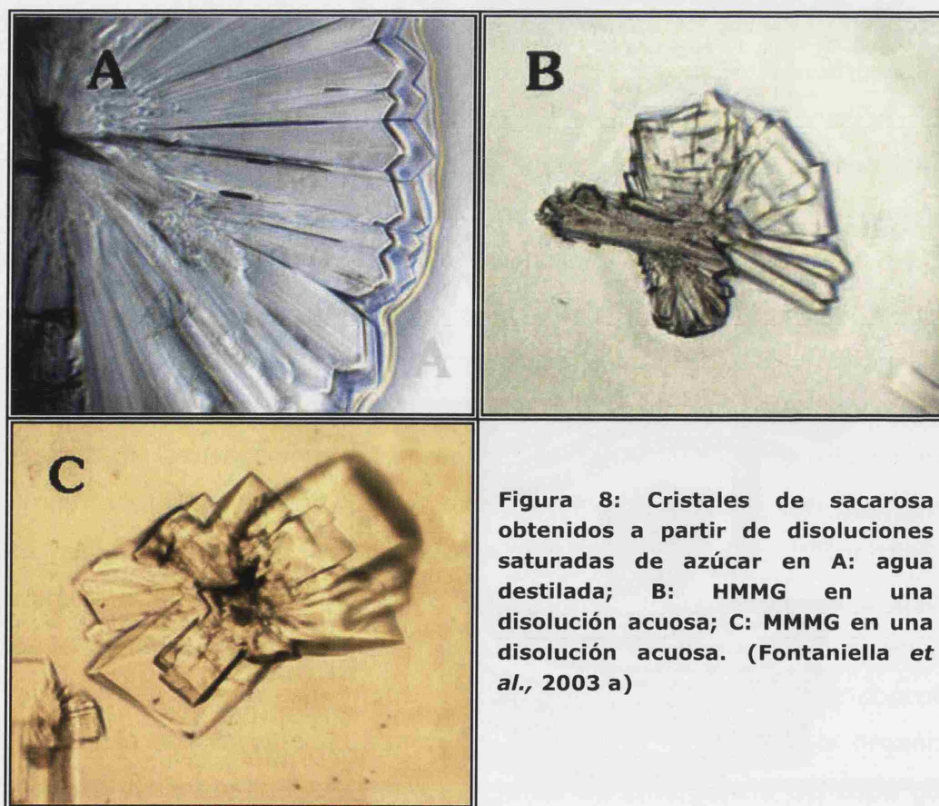


Figura 8: Cristales de sacarosa obtenidos a partir de disoluciones saturadas de azúcar en A: agua destilada; B: HMMG en una disolución acuosa; C: MMMG en una disolución acuosa. (Fontaniella *et al.*, 2003 a)

1.5. LA ESCALDADURA FOLIAR.

1.5.1 Historia y distribución.

Entre las enfermedades bacterianas más importantes que afectan al cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp) se encuentra la "escaldadura foliar", causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby, 1929; Dowson 1943). Dicha enfermedad, ocasionó serias pérdidas durante los primeros años tras su aparición en las cañas nobles, pero su control está siendo gradualmente asegurado por su reemplazamiento con variedades híbridas resistentes (Jiménez *et al.*, 2004).

North, en el año 1911 (citado en North, 1926), describió por primera vez la enfermedad en Australia. En el año 1930 fue descrita en Hawai, constituyendo la enfermedad más importante en el cultivo (Martín *et al.*, 1961). Existen evidencias por primera vez en Brasil en el año 1945 (Arruda y Amaral, 1945). Posteriormente, en 1966, se registró la enfermedad en Puerto Rico (Pan *et al.*, 1997). Síntomas de la escaldadura foliar fueron observados en algunas variedades de la colección mundial en Florida, Estados Unidos (Koike, 1968), y en ese mismo año se determinaron las variedades B49119 y B4362 como altamente susceptibles a la enfermedad (Martín *et al.*, 1961).

Posteriormente, en Trinidad, se observó en plántulas de la serie BT66 (Ogler y Goberdhan, 1970). En Panamá se observó que las variedades Cristal, B4362, B34104, B42231 y POJ2714 eran susceptibles a la escaldadura. En Taiwán se produjo un descenso en el contenido de azúcar en cañas maduras del 20,2% y 23,5%, comprobándose que el origen del problema era la presencia de esta bacteria en las plantas (Swings y Civerolo, 1993). En Guatemala y México se identificó por primera vez a *X. albilineans* en el año 1992 (Irvine y Amador, 1993; Ordosgoitti *et al.*, 1977). Luego, en 1993, se describió por primera vez en Louisiana, Estados Unidos, lográndose establecer que la enfermedad puede llegar a causar pérdidas económicas significativas de los campos comerciales y una pérdida de calidad en el cultivo de la caña (Grisham y Legendre. 1993). Asimismo, en 1993, se observaron líneas blanquecinas y clorosis sobre las hojas del híbrido LCP 82-89 de caña de azúcar en Texas, Estados Unidos. Se realizaron aislamientos de tejidos que mostraban dichos síntomas sobre medios selectivos y se desarrollaron colonias típicas de *X. albilineans* (Isakeit y Irvine, 1995).

Al año siguiente, en 1994, se registró por primera vez la escaldadura de la hoja en Colombia, observándose que la variedad CC85-92 presentó la más alta incidencia de la escaldadura (Guzmán *et al.*, 1997).

Luego, en diciembre del año 1995, fueron observados síntomas de la enfermedad en el cultivar B64277 en Francia y Guayana, donde fueron detectadas plantas asintomáticas en colecciones de germoplasma de caña de azúcar y en campos comerciales (Feldmann y Daugrois, 1997).

En Cuba fue detectada por primera vez en el año 1979 (Chinea y Rodríguez, 1994); síntomas típicos fueron observados en colecciones de germoplasma y en algunos campos comerciales, comprobándose la presencia del agente causal en ciento cincuenta aislamientos de diferentes localidades (Díaz *et al.*, 2000).

Actualmente la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en 67 países productores de caña de azúcar. La causa de nuevos brotes de la enfermedad es atribuida a nuevas cepas del organismo causal y las características de los mismos sugieren la existencia de variaciones intraespecíficas significativas entre cepas exóticas del patógeno. Tales variaciones se asocian a cambios en los patrones de diseminación del patógeno, con un mayor potencial para su transmisión aérea (Davis *et al.*, 1997). Se la considera en la actualidad como una enfermedad potencialmente peligrosa, causando pérdidas en el rendimiento agrícola, lo que afecta a su vez, al contenido de sacarosa en el jugo.

1.5.2. Fases y síntomas de la enfermedad.

La escaldadura foliar se manifiesta en tres fases bien diferenciadas: la fase crónica, la fase aguda y la fase latente. La primera presenta varios síntomas exteriores. Se puede destacar la presencia de una estrecha línea blanco-amarillenta, de 1-2 mm de ancho, que recorre la hoja en paralelo a la nervadura principal y que se multiplica en sucesivas líneas paralelas. En algunos casos, las estrías se extienden hacia abajo en la vaina. En ocasiones, la estría blanca puede presentar zonas con una necrosis rojiza (**Fig. 9 A,B**).

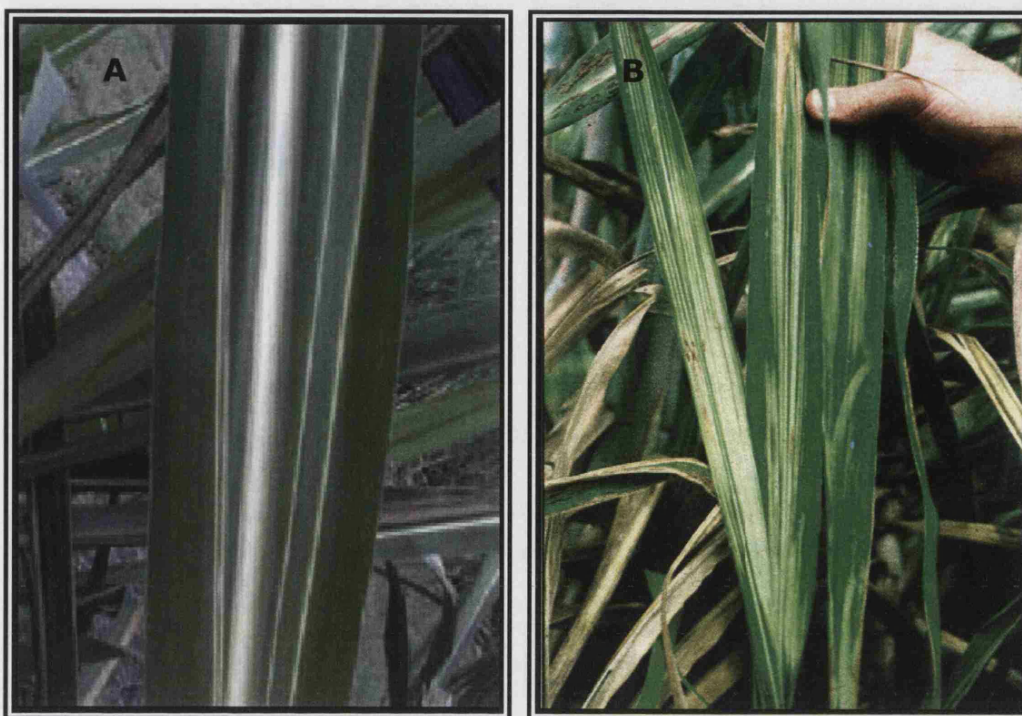


Figura 9 (A y B): Síntomas característicos de la infección causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* en la caña de azúcar en la fase crónica de la enfermedad.

Una sección longitudinal de los tallos afectados de forma crónica muestra estas finas rayas de un color rojo brillante, que son los haces fibrovasculares enrojecidos debido a la necrosis producida. Son particularmente pronunciados en la región nodal y son más patentes en los tejidos maduros (Rott y Davis, 2000; Croft *et al.*, 2000).

En la fase crónica, una sola cepa puede presentar a menudo tallos sanos y tallos infectados. En los tallos de mayor edad se pueden producir brotes laterales o "lalas", que presentan en general hojas cloróticas y pueden manifestar las estrías características; estas lalas no sobreviven al sembrarlas (Ricaud y Ryan, 1989) (**Fig.10**).

En la fase aguda de la enfermedad, la línea blanco-amarillenta puede ser más ancha y más difusa, llegando incluso a extenderse hasta el borde de la hoja y provocando marchitamiento y necrosis. La progresiva desecación de los tejidos provoca la hipertrofia de las células buliformes, diferenciaciones epidérmicas que inducen el enrollamiento del limbo foliar para tratar de evitar la desecación, minimizando las pérdidas de vapor de agua por transpiración (Solas *et al.*, 2003) (**Fig.11**).



Figura 10: Germinación de yemas laterales y proliferación de "lalas" debidas a la enfermedad.

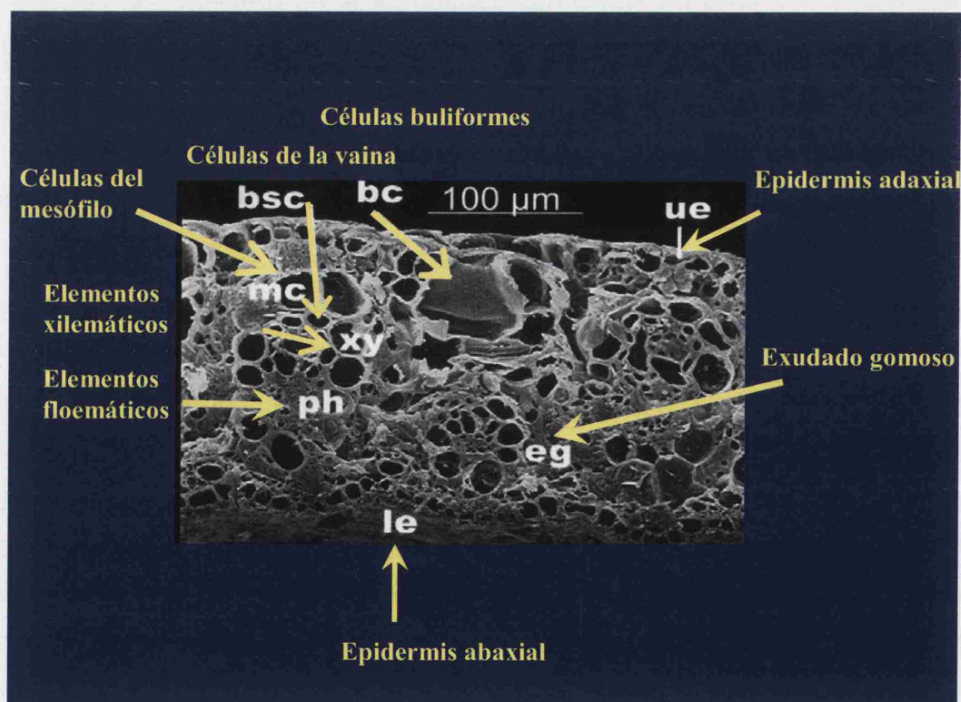


Figura 11: Magnificación de una sección transversal de hoja enferma mostrando el notable aumento de las células buliformes como consecuencia de los primeros síntomas de desecación. El patógeno está confinado en los haces vasculares de tallo y hojas, los cuales están a menudo parcialmente ocluidos por un exudado gomoso segregado por la bacteria, identificado como un xantano. Se puede apreciar un relieve muy irregular de la epidermis abaxial.

La enfermedad puede producir una clorosis parcial o total del limbo y un desarrollo anormal de tallos laterales sobre el eje principal de la caña, siendo los basales de crecimiento más rápido que los apicales (Rott *et al.*, 1997). Los tallos pueden presentar enanismo (debido al acortamiento producido en los entrenudos) y mostrar signos de marchitamiento con hojas rígidas. Los nuevos brotes exhiben los mismos síntomas de las plantas adultas. En los nudos y entrenudos pueden aparecer cavidades prominentes. En esta fase, se produce un marchitamiento brusco seguido de la muerte de los tallos, a menudo sin mostrar sintomatología previa, como si los hubiese matado la sequía (Martín y Robinson, 1961). Esta fase generalmente ocurre cuando la caña ha pasado por condiciones de tiempo seco seguido por un período lluvioso (Ricaud y Ryan, 1989).

En la fase latente de la enfermedad, no se observan síntomas en el follaje que permitan sospechar la presencia de la bacteria causal en los tejidos internos. En la mayoría de los casos, la fase latente se presenta en variedades resistentes o tolerantes, y sobre todo cuando las condiciones ambientales son excelentes para el desarrollo de la caña. La enfermedad en esta fase a veces se puede reconocer por la presencia de pequeñas rayas rojizas en el interior de los tejidos del tallo, similares a las observadas en la fase crónica. Su diagnóstico exacto requiere del aislamiento del organismo y de pruebas serológicas complementarias (Ricaud y Ryan, 1989; Purseglove, 1979; Hayward, 1974; Agnihotri, 1990).

1.5.3. Transmisión y control de la enfermedad.

La transmisión de *X. albilineans*, agente causal de la escaldadura foliar en la caña de azúcar, se produce principalmente por la utilización de semilla infectada en el establecimiento de campos comerciales y por empleo de equipos y herramientas infectadas, sobre las cuales se ha comprobado que el patógeno puede sobrevivir hasta un tiempo máximo de seis días. Una vez que se ha producido la contaminación de las herramientas, éstas transmiten con relativa facilidad la bacteria a los tallos sanos (Ricaud y Ryan, 1989). Hay también evidencias que apuntan a una transmisión desde el suelo y la atmósfera (Saumtally *et al.*, 1996). En Australia, una de las principales regiones del mundo afectadas por la enfermedad, la propagación de la bacteria ocurre durante el corte de la caña a través del uso de machetes contaminados y cosechadoras mecánicas cuyas cuchillas se contaminan fácilmente al cortar tallos enfermos, convirtiéndose en excelentes diseminadoras de la bacteria hacia los tallos sanos.

Eventualmente, el agua de riego superficial utilizada en una plantación afectada también puede constituir un agente efectivo de transmisión, al pasar la bacteria de plantas enfermas a plantas sanas, o cuando los sobrantes del riego de una plantación afectada son utilizados para el riego de otras plantaciones.

Respecto a las medidas de control, la manera más efectiva de controlar la enfermedad es mediante el empleo de variedades resistentes, la adecuada selección de semillas sanas, la extirpación del material enfermo de los semilleros y la desinfección frecuente de las herramientas utilizadas para el corte con productos químicos como el Vanodine o el Sanivet al 1%. Una inmersión instantánea del machete en una de estas dos disoluciones es suficiente para limpiar o descontaminar las herramientas.

Mientras se obtienen variedades comerciales resistentes, se pueden cultivar aquellas que no han presentado síntomas o que son moderadamente afectadas, siempre y cuando se utilice semilla sana, libre de la infección, que debe provenir de semilleros tratados térmicamente.

En la mayoría de los casos, *X.albilineans*, es resistente a los tratamientos de termoterapia que comúnmente se efectúan sobre la semilla vegetativa para controlar el raquitismo de la soca, enfermedad causada por la bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, que también afecta a la caña de azúcar. (Davis *et al.*, 1984; Evtushenko *et al.*, 2000).

Con relativo éxito, para escaldadura de la hoja se ha empleado el sistema dual térmico en el cual se procede cortando la semilla en fragmentos de una o dos yemas, se sumergen dichos fragmentos completamente en agua a temperatura ambiente durante 24 a 48 h y posteriormente se les somete a un tratamiento con agua caliente (50° C) durante 3 h (Ricaud y Ryan, 1989).

1.5.4. *Xanthomonas albilineans*. Organismo causai de la escaldadura foliar en la caña de azúcar.

X. albilineans (Ashby 1929) Dowson (1943), es un organismo unicelular, perteneciente a la División: Bacteria, Filo: Proteobacteria; Clase: Gammaproteobacteria; Orden: Xanthomonadales; Familia: Xanthomonadaceae, Género: *Xanthomonas*. Está bacteria también es conocida como *Agrobacterium albilineans* (Ashby 1929) Savulescu (1947), *Bacterium albilineans* (Ashby 1929), *Phytomonas albilineans* (Ashby 1929) Magrou (1937), *Pseudomonas albilineans* (Ashby 1929) Krasil'nikov (1949), o *Xanthomonas albilineans* var. *paspali*.

El género *Xanthomonas* comprende bacilos rectos y cortos, Gram-negativos, con flagelación monotrica. En medio agar, producen un pigmento amarillo no difusible en el medio, hidrolizan Tween 80, no reducen nitratos (NO_3^-), ni producen H_2S y su crecimiento es inhibido con cloruro de tetrazolium al 0.15%.

Existen varias especies pertenecientes a este género, causantes de enfermedades en plantas, entre las que se puede destacar a *X. campestris* path. var. *vasculorum*, causante de la gomosis en Crucíferas y subsidiariamente en la caña de azúcar, *X. ampelina*, causante de la necrosis bacteriana de la vid., *X. axonopodis* pv. *citri*, causante del cáncer de los cítricos, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, causante del rayado bacteriano de la hoja del arroz, entre otras.

X. albilineans es una bacteria Gram negativa, bacilar, aerobia, no esporulante y móvil gracias a un único flagelo polar (Dowson, 1943). Las colonias de las bacterias aisladas tras ser cultivadas en medio Wilbrink modificado (Davis *et al.*, 1994) presentan una coloración amarillo pálido debido al pigmento xantomonadina que producen, son brillantes, de pequeño tamaño, convexas y no mucoides (**Fig.12**). Se caracteriza por un crecimiento lento (de cuatro a ocho días), y presenta resistencia a los antibióticos.



Figura 12: Colonias de *Xanthomonas albilineans* crecidas en medio Wilbrink.

En distintos países se han registrado diversas gramíneas como hospedantes naturales de la bacteria *X. albilineans*. Entre otras, se cuentan los pastos de dallis (*Paspalum dilatatum*), horquetilla (*Paspalum conjugatum*), brachiaria (*Brachiaria piligera*), guinea (*Panicum maximum*), elefante (*Pennisetum purpureum*), caminadora (*Rottboellia cochinchinensis*) y maíz (*Zea mays*).

Aparentemente, la bacteria puede sobrevivir durante mucho tiempo en estas gramíneas y convertirse en fuente de inóculo para la caña de azúcar (Ricaud y Ryan, 1989).

1.5.5. La albicidina como factor de virulencia.

X. albilineans produce una amplia familia de potentes antibióticos y fitotoxinas denominadas albicidinas, las cuales son clave de patogenicidad y del desarrollo sistemático de la escaldadura foliar de la caña de azúcar (Ricaud y Ryan, 1989; Zhang *et al.*, 1998a, 1999). Cerca de su concentración mínima inhibitoria, la albicidina causa un bloqueo completo de la síntesis de DNA seguido de una inhibición parcial de la síntesis de RNA y proteínas y es causante de la clorosis producida en la planta, como consecuencia del bloqueo del desarrollo cloroplástico (Birch y Patil, 1985b, 1987a, b). A pesar del papel bactericida que desarrolla la albicidina frente a un amplio rango de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, también es considerada como un potente antibiótico clínico (Birch y Patil 1985a). Los bajos rendimientos de albicidina obtenidos de la bacteria *X. albilineans* (0,2 mg de toxina purificada por litro en cultivo) (Birch y Patil, 1985b) han retrasado los estudios de la estructura química de la toxina, de la producción de albicidina durante el desarrollo de la enfermedad y de sus potentes aplicaciones terapéuticas.

Una caracterización parcial de la albicidina obtenida mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones y ^{13}C , sugieren que el compuesto está formado por varios anillos aromáticos y aproximadamente 38 átomos de carbono. A su vez, un análisis por espectrometría de masas indica que el peso molecular de la albicidina es de aproximadamente 842 Da y que dicha molécula contiene en su extremo un grupo carboxilo. La albicidina es soluble en metanol, tetrahidrofurano, dimetil sulfóxido y acetona al 95%, moderadamente soluble en agua y acetonitrilo e insoluble en disolventes menos polares. Se han llevado a cabo pruebas con reactivos en forma de aerosol (Stahl, 1969), obteniéndose reacciones propias de grupos ácido y fenol. La actividad inhibitoria de la albicidina disminuye por tratamiento con $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de pronasa durante 3 h a 37°C . Se han llevado a cabo estudios de mutagénesis y complementación para llegar a dilucidar las bases genéticas de la síntesis de albicidina en *X. albilineans*.

Se pueden destacar tres genes implicados en la síntesis de albicidina: *xabA*, *xabB*, y el *xabC*. El gen *xabB* codifica una proteína larga con una arquitectura modular indicativa de una proteína quinasa multifuncional (PKS) unida a una péptido sintasa no ribosomal (NRPS) (Huang *et al.*, 2001) (**Fig.13**).

El gen *xabC*, localizado inmediatamente a continuación del gen *xabB*, codifica una O-metiltransferasa-S-adenosil-L-metionina-dependiente (Huang *et al.*, 2000a) (**Fig.13**).

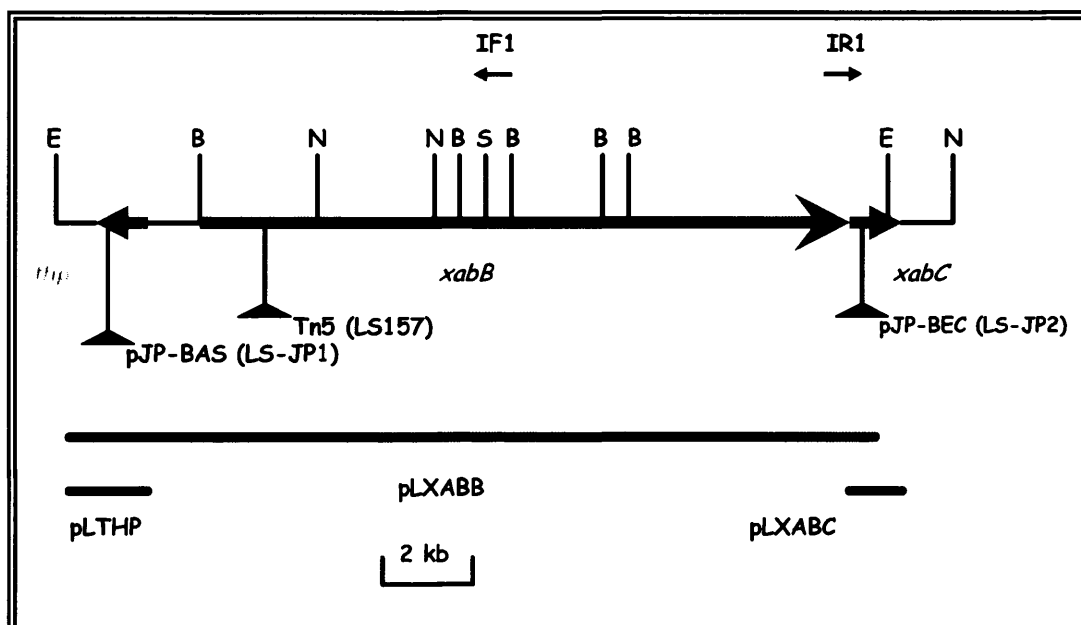


Figura 13: Organización de una parte del cluster genómico responsable de la biosíntesis de la albicidina. La situación y dirección de los tres ORFs (Open Reading Frame) están indicados con las flechas de mayor grosor. Las líneas verticales indican la posición de las enzimas de restricción: E, *EcoRI*; B, *Bam HI*; S, *SpeI*; N, *NcoI*. Las líneas verticales con triángulos (Δ) indican la posición de los lugares de posición mutagénicos o el lugar de inserción Tn5, y los mutantes resultantes están indicados entre paréntesis. Las flechas situadas encima del mapa físico, indican la situación de los primers utilizados para amplificar la secuencia "downstream" del lugar de restricción de *EcoRI* mediante IPCR. Las regiones clonadas mediante ensayos de complementación se muestran debajo del mapa.

El gen *xabA*, localizado en otra región del genoma, codifica una fosfopanteteinil tranferasa necesaria para la activación enzimática post-traducciona de PKS y NRPS (Huang *et al.*, 2000b) (**Fig.14**).

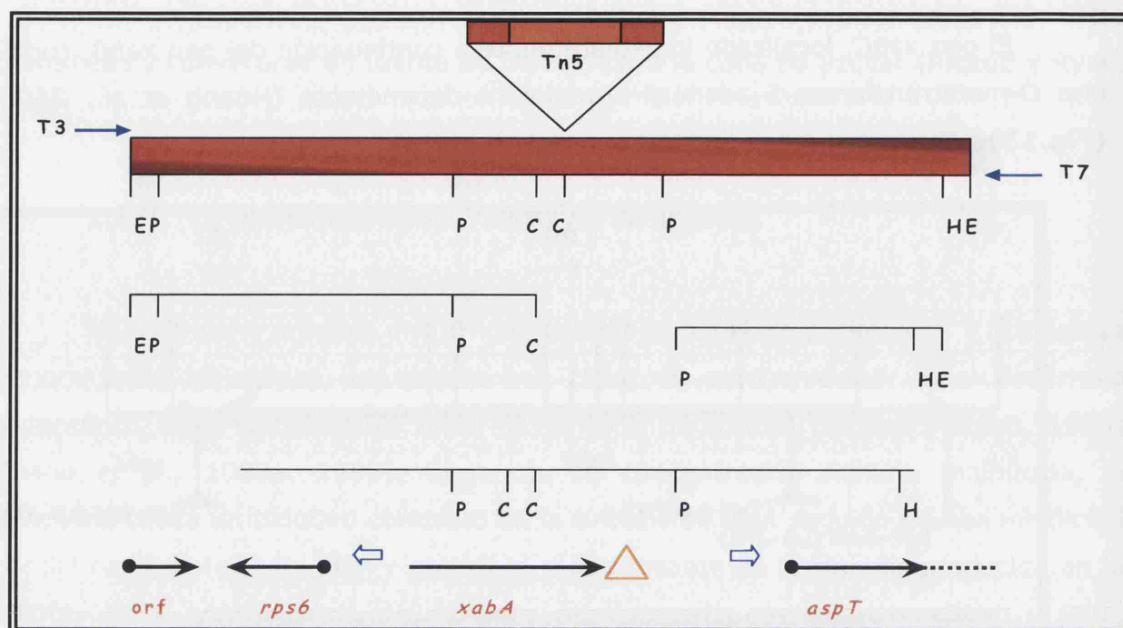


Figura 14: Mapa de restricción de los clones incluyendo el gen *xabA* de *Xanthomonas albilineans*. La situación y dirección de la transcripción de *xabA*, y los demás ORFs indicados mediante la secuencia de análisis, están señalados por flechas. El evidente terminador transcripcional está indicado como Δ ; el promotor \Rightarrow ; RBS \bullet . Las enzimas de restricción utilizadas son: E, *EcoRI*; P, *PstI*; C, *ClaI*; y H, *HindIII*.

El sistema descrito hasta ahora guarda una curiosa semejanza con la elucidación del sistema genético que codifica para epotilonas en *Sorangium cellulosum*. Tang *et al.* (2000) han sido capaces de clonar un conjunto de genes para la síntesis de epotilonas, de 56 kb, e introducirlo en *Streptomyces coelicolor*, un microorganismo que replica diez veces más deprisa que *S. cellulosum* y, por tanto, de mucho mayor interés industrial. Este gen expresa prácticamente todas las proteínas necesarias para la síntesis de epotilonas. Es capaz de codificar 9 módulos de una policetona sintasa (PKS), enzima que incorpora unidades cetona de dos átomos de carbono hasta construir el esqueleto de la epotilona, un módulo de una péptido sintetasa no ribosómica (NRPS), una citocromo P450 epoxidasa y dos proteínas transportadoras de antibiótico.

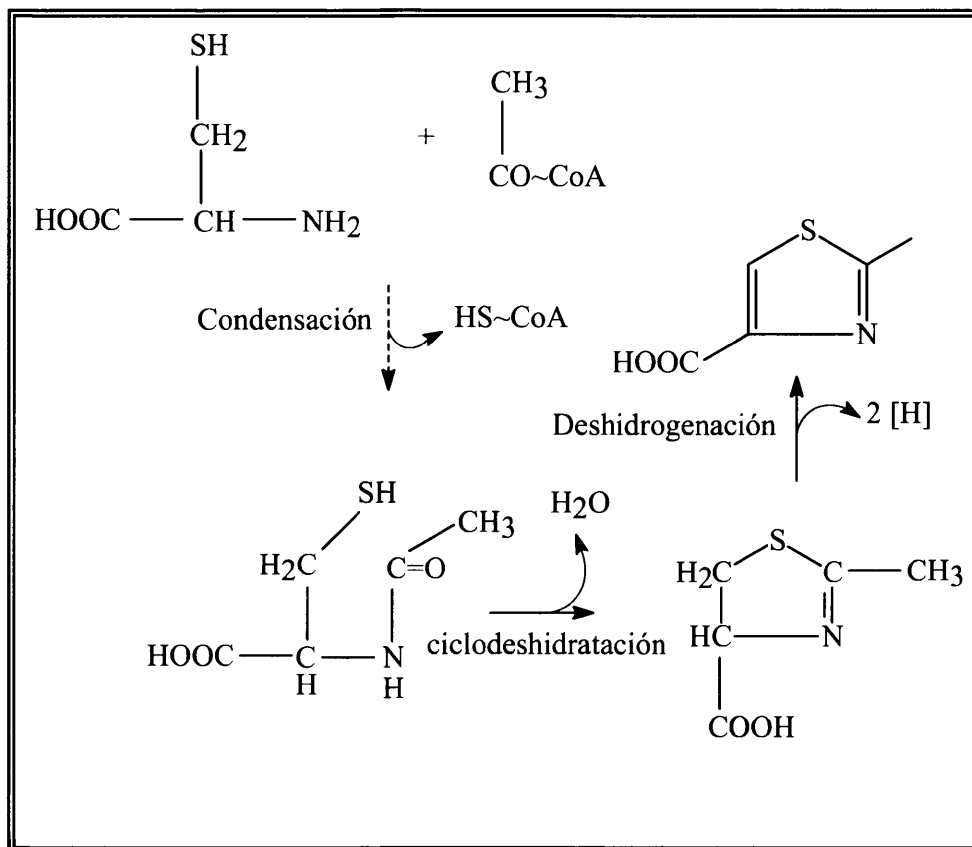


Figura 15: Reacción de formación del heterociclo tiazol por acción del primer módulo de una policetona sintasa (PKS).

El primer módulo del sistema PKS y el módulo NRPS cooperan en la formación del heterociclo tiazol de la epotilona a partir de acetato y cisteína, por reacciones sucesivas de condensación, ciclodeshidratación y deshidrogenación (**Fig.15**). Posiblemente esta última transformación sea función de un dominio enoil reductasa en el primer módulo PKS, dominio que hasta ahora se había venido considerando como críptico. Los sucesivos módulos PKS contienen la deshidrasa correspondiente salvo el módulo 4, que carece de ella, debiendo haber sido responsable de la deshidratación que construye un doble enlace entre los carbonos 12 y 13, lo que daría lugar a la formación de las epotilonas C y D. Por tanto, esta deshidratación podría llevarse a cabo gracias al dominio DH del siguiente módulo, lo cual sería atípico, bien gracias a una enzima post-PKS modificadora de la estructura (**Fig. 16**).

Los genes *albA* de *Klebsiella oxytoca* y el gen *albB* de *Alcaligenes denitrificans*, codifican unas proteínas de carácter básico (ambas con puntos isoeléctricos de 10.9) que se unen a la albicidina para formar un complejo sin actividad antibiótica. El mecanismo de actuación de estos genes es de momento desconocido, y no está claro cómo estos microorganismos pueden mantener de forma natural contacto con la albicidina.

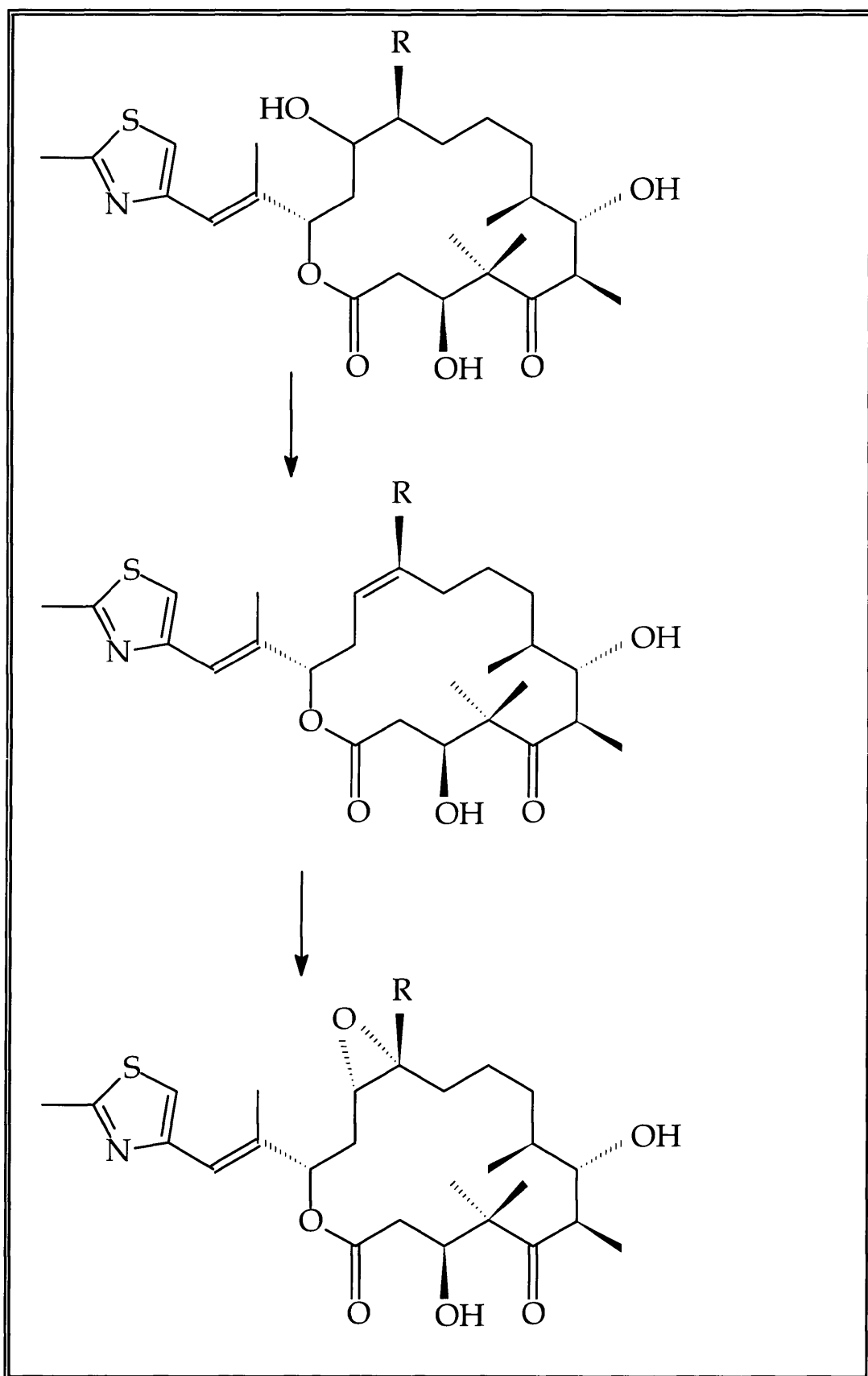


Figura 16: Las últimas deshidrataciones que conducen a la estructura final de las epotilonas.

La unión de la albicidina a ambas proteínas es reversible mediante desnaturalización con calor, incluso en células intactas, indicando que estas proteínas no modifican directamente la unión covalente de la albicidina a sus ligandos (Basnayake y Birch, 1995; Walker *et al.*, 1988).

Existe un único sitio de unión de alta afinidad sobre AlbA con una $K_d = 6.4 \cdot 10^{-8}$ M, por lo que el complejo AlbA-albicidina es muy estable (Zhang *et al.*, 1998b). Las proteínas AlbA y AlbB muestran una secuencia similar únicamente en los 15 aminoácidos del extremo N-terminal. Los genes *albA* y *albB* confieren una mayor resistencia cuando son expresados en *E.coli*. Estos genes son de gran interés para los posibles avances transgénicos en la resistencia a la escaldura foliar y para la producción de una matriz de afinidad que permita una eficiente purificación de antibióticos de tipo albicidina (Zhang *et al.*, 1998b).

La bacteria *Pantoea dispersa* (también llamada *Erwinia herbicola*), resistente a la albicidina, fue aislada de caña de azúcar afectada por la escaldadura foliar. Dicha bacteria, mostró una elevada capacidad detoxificante a nivel extracelular frente a la albicidina. El organismo proporciona un completo biocontrol frente a la transmisión de la enfermedad cuando se coinocula con *X. albilineans*, incluso cuando las concentraciones del patógeno se incrementan 10^3 veces en plantas que son altamente susceptibles a la enfermedad (Zhang y Birch, 1996, 1997b).

El gen *albD* clonado de esta bacteria, codifica una esterasa perteneciente a la superfamilia de las serin-hidrolasas. La proteína AlbD detoxifica de todos los antibióticos de tipo albicidina producidos en cultivo con *X. albilineans*, sobre un amplio rango de temperatura y pH y sin requerimiento de un complejo cofactor. El gen aumenta en 200 veces la resistencia a la albicidina cuando es expresado en *E.coli* (Zhang y Birch, 1997a).

Clones cósmidos, involucrados en las regiones conocidas de biosíntesis de la albicidina en *X. albilineans*, no confieren resistencia a la albicidina en *E. coli*. Recientemente, el gen de una proteína involucrado en el transporte de la albicidina ha sido clonado de *X. albilineans* y se ha visto que se produce un aumento en la resistencia a la albicidina cuando es expresado en *E. coli* (Bostock, et al., 2006). Las plantas con capacidad detoxificante de albicidina no desarrollan los síntomas cloróticos de la enfermedad en hojas inoculadas, mientras que las plantas no transformadas presentan síntomas severos de la enfermedad.

Las líneas transgénicas con alta actividad AlbD en tallos jóvenes también están protegidas frente a multiplicaciones sistémicas del patógeno, acción precursora de la enfermedad.

1.6. XANTANO.

1.6.1. Características generales del xantano.

El xantano, o goma xantana, es un polisacárido extracelular producido por las bacterias del género *Xanthomonas*, y fue descubierto por primera vez en la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459. *X. campestris* pertenece a la familia *Xanthomonadaceae* (mencionada en el apartado anterior titulado Escaldadura foliar), por lo que la bacteria *X. campestris* comparte las características ya mencionadas en dicho apartado. Cabe destacar que todos los medios de cultivo empleados para el crecimiento de este microorganismo son bastante complejos.

Los medios de cultivo más utilizados son el YM (Jeanes *et al.*, 1976) y una variante semisintética de este medio denominada YM-T (Cadmus *et al.*, 1978). El crecimiento de la bacteria en ambos medios es similar y los rendimientos máximos de biomasa obtenidos son también muy similares. Sin embargo, las dos fuentes de nitrógeno que lleva incorporado el medio YM-T hacen que el patrón de crecimiento obtenido en dicho medio sea diaúxico (Santos, 1993).

X. campestris se ha cultivado en un rango de diferentes temperaturas comprendido entre los 25° C y los 30° C (Rogovin *et al.*, 1965; Moraine y Rogovin, 1971; Silman y Rogovin, 1972; Kennedy *et al.*, 1982; de Vuyst *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1989; Schweickart y Quinlan, 1989; Shu y Yang, 1990). Varios autores (Moraine y Rogovin, 1966; Shu y Yang, 1990, 1991; Santos, 1993) han estudiado cómo influye la temperatura en el crecimiento de la bacteria utilizando un rango de temperaturas comprendido entre 22 y 35° C, observándose que la temperatura óptima de crecimiento en el medio de cultivo es de 28° C (Santos, 1993).

El aspecto físico del xantano es el de un polvo color crema que se disuelve en agua caliente o fría produciendo disoluciones de viscosidad relativamente alta a concentraciones bajas. La viscosidad es alta en un amplio intervalo de concentraciones y las disoluciones son estables en un amplio rango de pH, concentración de sales y temperaturas. Estas características son muy favorables para la economía de operaciones en las que se le usa como espesante. El descubrimiento del xantano fue el resultado de un programa de búsqueda sistemática o *screening* iniciado por el departamento de agricultura de EEUU.

Como consecuencia del éxito comercial del dextrano en la década de 1940, el departamento inició un programa exhaustivo de búsqueda de microorganismos capaces de producir polisacáridos solubles en agua en cultivos sumergidos. El resultado de este programa fue el descubrimiento del xantano en la década de 1950 en los laboratorios del Northern Regional Research Laboratories (NRRL).

Durante la década de 1960 se llevaron a cabo investigaciones a escala piloto en varios laboratorios industriales y la producción comercial comenzó a principios de 1964. El conocimiento acumulado en la época sobre los requerimientos nutricionales de *X. campestris* era amplio por tratarse de un importante fitopatógeno, causante de enfermedades en crucíferas y subsidiariamente en la caña de azúcar.

El xantano se convirtió en el primer producto biopolimérico de una fermentación de azúcar de maíz que tuvo importancia comercial. A raíz de su éxito, comenzaron a estudiarse otros polisacáridos microbianos, pero hasta el momento, el xantano es el que posee mayor volumen de producción, rango de aplicaciones y el único aprobado para uso en alimentos. A finales de 1992 la capacidad mundial de producción de biopolímeros (principalmente xantano) excedía las 30.000 toneladas anuales a precios de 10 a 20 US\$ kg⁻¹ y en 1996 constituía el segmento de la industria de polisacáridos de mayor crecimiento, con un 7% anual, desplazando a otras gomas naturales (Flores-Candia, 1998; Slodki, 1998).

1.6.2. Estructura.

La molécula de xantano producido por *X. campestris*, consta de una cadena principal de D-glucopiranosido con enlaces β -1,4, semejante a la celulosa. A la cadena se anexan cadenas laterales de trisacárido compuestas por residuos de D-manopiranosido y de ácido D-glucurónico. Los residuos de manósido con enlace α -1,2 tienen sustituciones 6-O-acetilo. Un promedio de aproximadamente la mitad de los grupos terminales del α -D-manósido tienen sustituciones 4,6-O-(1-carboxietilideno), por ejemplo el ácido pirúvico con enlace 4,6 acetal. Se le asigna como fórmula promedio C_{32.34}H_{49.94}O_{28.34}Na_{1.38} (**Fig.17**).

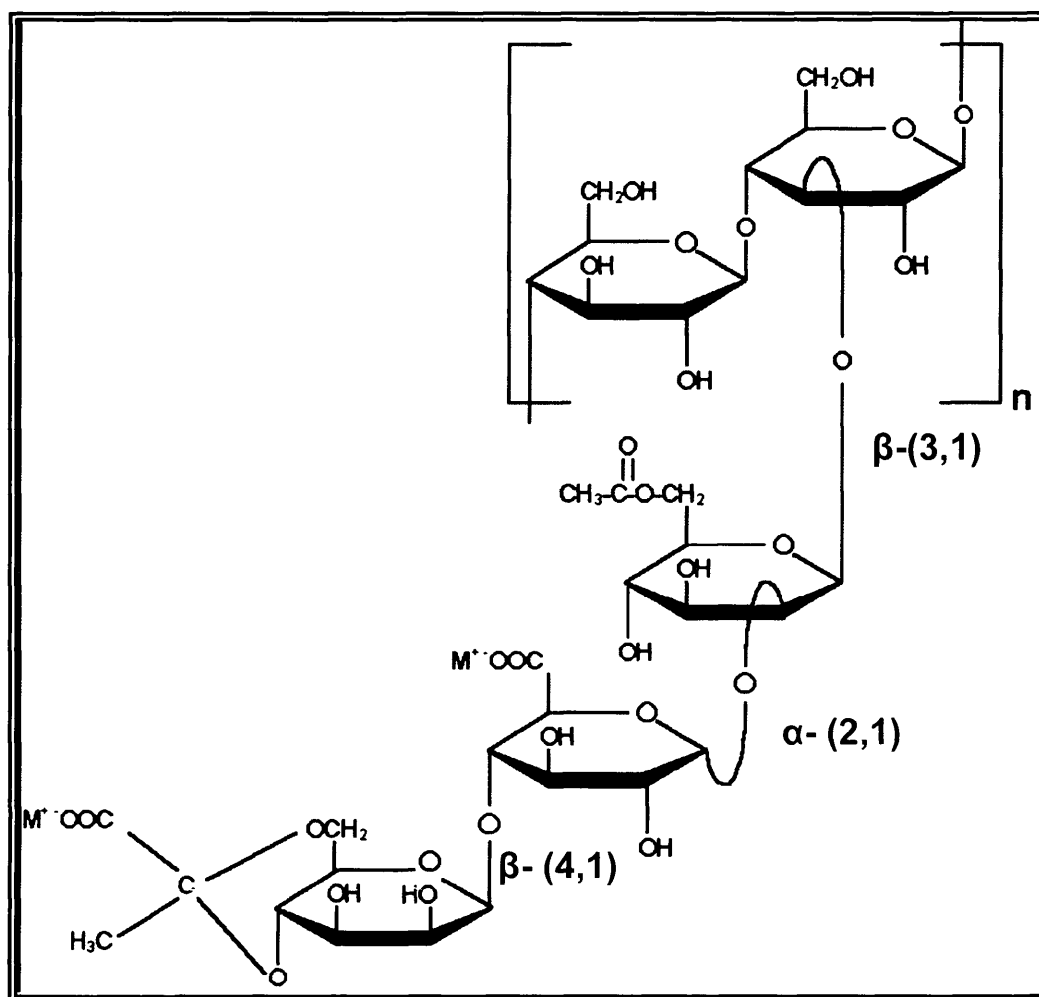


Figura 17: Estructura del xantano de *Xanthomonas campestris*. $M^+ = Na, K \text{ o } \frac{1}{2} Ca$.

Algunas aplicaciones industriales requieren que el contenido de piruvato supere el 3.3% en peso, siendo su valor el mejor indicador de la calidad del producto (Flores-Candia, 1998). La distribución de pesos moleculares del xantano abarca el rango de 2 a 16×10^6 Da y depende de las condiciones de fermentación (García-Ochoa, 2000).

1.6.3. Propiedades reológicas.

La molécula de xantano tiene dos conformaciones, una de hélice y otra de cadena desordenada, dependiendo de la temperatura a la cual se realiza la disolución. Esto hace que la viscosidad de la disoluciones dependa no solo de la temperatura a la

cual se mide la viscosidad sino también de la temperatura a la cual se disuelve el polisacárido (García-Ochoa *et al.*, 2000 a).

Las disoluciones de xantano son estables respecto de la acción del calor en un amplio intervalo de temperaturas y su estabilidad aumenta con sales catiónicas mono y divalentes. La viscosidad es independiente del pH en presencia de sales a pH entre 1 y 13 (Slodki, 1998).

El comportamiento reológico de las disoluciones de xantano ha sido descrito mediante la ecuación de Ostwald de Waele y la ecuación de Casson, mostrando ambos modelos un excelente ajuste a los datos experimentales en el rango de velocidades de corte de 0.39 a 79.2 s⁻¹ (García-Ochoa, 2000).

$$\tau = K \gamma^n = (K \gamma^{n-1}) \gamma \mu_a = K \gamma^{n-1} \text{ Ecuación de Ostwald de Waele}$$

$$\tau^{0.05} = \tau_0^{0.5} + K_c \gamma^{0.5} \text{ Ecuación de Casson}$$

en donde μ_a es la viscosidad aparente, γ la velocidad de corte, τ la tensión de corte, K el índice de consistencia, n el índice de comportamiento y K_c la constante de Casson. Estos parámetros son funciones conocidas de la concentración y temperatura de medición y se tabulan para diferentes temperaturas de disolución.

La relación de la viscosidad aparente con la concentración puede calcularse mediante la siguiente ecuación empírica, obtenida a partir del modelo Ostwald de Waele bajo condiciones constantes de velocidad de corte y temperatura de disolución.

$$\mu_a = a c_p^b$$

1.6.4. Interacción con otras gomas.

La propiedad más excepcional del xantano es la reactividad con galactomananos como la goma de guar y la goma de algarrobo. La adición de cualquiera de estos galactomananos a una disolución de xantano a temperatura ambiente causa un incremento sinérgico de la viscosidad. La viscosidad de estas mezclas depende del xantano y de las estructuras de los galactomananos (Dea *et al.*, 1986; Casas y García-Ochoa, 1999). Los cambios conformacionales del xantano en disolución dependen de la temperatura de la misma. Cuando el xantano es disuelto a bajas temperaturas (inferiores a 40°C), adquiere una conformación ordenada que

Introducción

permite una mejor interacción entre las moléculas del xantano y el galactomanano (**Fig.18**). (Dea *et al.*, 1977; Tako y Nakamura, 1984; Casas y García-Ochoa, 1999).

La goma guar y la goma de algarrobo son los galactomananos más utilizados a nivel industrial (Maier *et al.*, 1993).

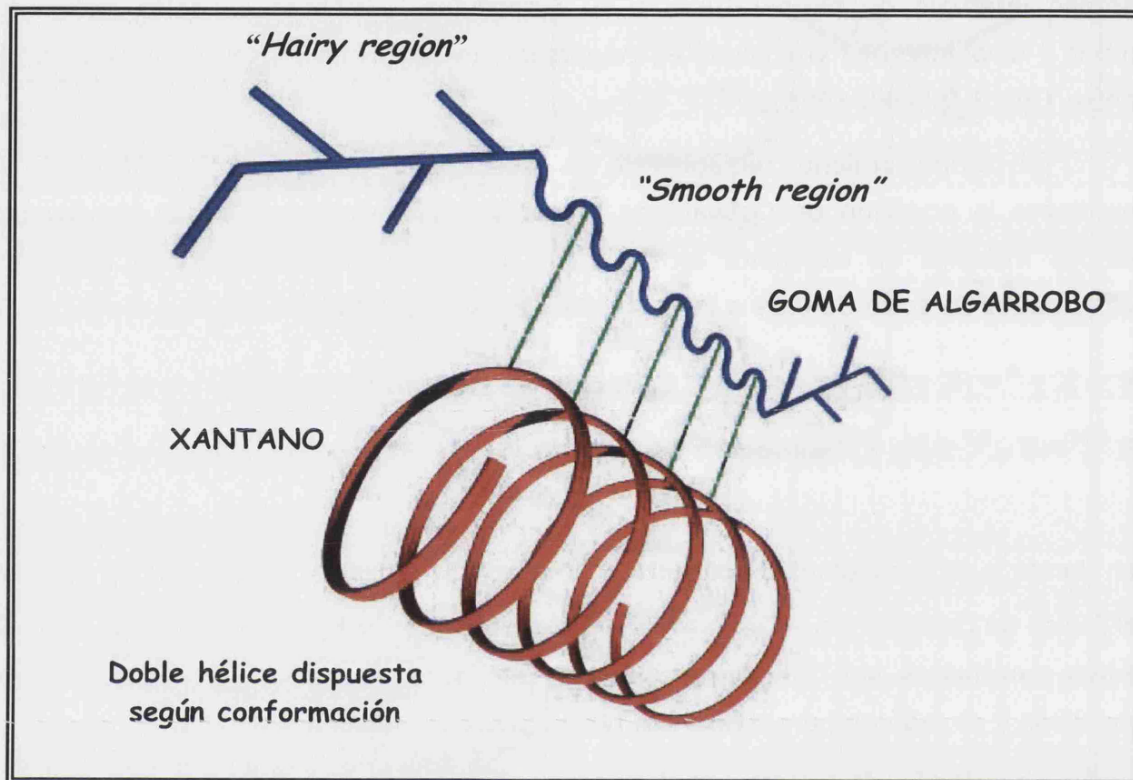


Figura 18: Interacción entre el xantano y el galactomanano.

Están formados por una cadena principal de unidades de manosa asociadas a una unidad monomolecular de galactosa. La relación entre galactosa y manosa y su distribución en la cadena principal es característica de cada galactomanano (Hui y Neukon, 1964). Los residuos de galactosa no tienen una distribución uniforme; existen regiones sin galactosa también conocidas como "*smooth regions*", y otras regiones presentan un elevado número de residuos de galactosa conocidas con el nombre de "*hairy regions*". Las "*smooth regions*" son las que favorecen la interacción con la molécula del xantano, pero esta región es soluble sólo a 80°C (Hui y Neukon, 1964; Dea *et al.*, 1977; García-Ochoa y Casas, 1992). Por ello, la interacción entre el xantano y el galactomanano es favorable cuando el xantano es disuelto a temperaturas inferiores a 40°C y el galactomanano a elevada temperatura (80°C). Las combinaciones de xantano y goma de algarrobo forman geles elásticos mientras que las combinaciones de xantano con goma guar producen viscosidades más elevadas de lo esperado pero no forman gel (Cottrell y Baird, 1998).

1.6.5. Toxicidad.

Las propiedades toxicológicas y de seguridad del xantano se investigaron intensamente para determinar su aplicabilidad en alimentos y fármacos (García-Ochoa *et al.*, 2000a). El xantano no es tóxico y no inhibe el crecimiento. No provoca sensibilización ni irritación ocular o de la piel. La Food and Drug Administration (FDA) de EEUU lo aprobó en 1969 como aditivo alimentario sin ningún límite específico de cantidad. En 1980, la comunidad económica europea agregó el xantano a la lista de emulsificantes/estabilizantes alimentarios permitidos con el número de ítem E-415.

1.6.6. Aplicaciones.

El xantano se agrega a los alimentos para controlar la reología del producto final. El polímero produce un gran efecto sobre propiedades como la textura, liberación de aroma y apariencia, que contribuyen a la aceptabilidad del producto para su consumo. Por su carácter pseudoplástico en disolución, el xantano produce una sensación menos gomosa en la boca que las gomas con comportamiento newtoniano (Flores-Candia, 1998; García -Ochoa *et al.*, 2000a). Su comportamiento como antioxidante es mayor que el de otros polisacáridos debido a su gran capacidad de unirse a metales y a su comportamiento viscoso (**Tabla IV**).

En la industria farmacéutica y cosmética el xantano se usa como agente emulsificante y para dar cuerpo al preparado. Los productos de cuidado personal como champú, cremas, lociones, maquillajes, productos de cuidado capilar y dentífrico pueden formularse con xantano. El xantano otorga a las cremas y lociones una buena sensación en la piel durante y después de la aplicación. En la industria farmacéutica, el xantano se usa para mantener en suspensión los antibióticos u otros fármacos y para lograr formulaciones de dosificación uniforme o estabilizar cremas conteniendo fármacos.

En las aplicaciones agrícolas, el xantano se usa como agente de suspensión o espesante. Se utiliza para mejorar la eficiencia de fungicidas, herbicidas e insecticidas al suspender uniformemente los componentes sólidos de las formulaciones en sistemas acuosos o al estabilizar emulsiones y sistemas multifásicos líquidos.

Las propiedades reológicas del xantano facilitan la pulverización, reducen la dispersión con el viento e incrementan la persistencia y adhesión del pesticida.

USO	APLICACIÓN
Adhesivo	Glaseados y recubrimientos
Aglutinante	Alimentos para mascotas
Recubrimiento	Confitería
Emulsificante	Aderezos para ensaladas
Encapsulante	Saborizantes en polvo
Formación de película	Recubrimientos protectores, envoltura de salchichas
Estabilizante de espuma	Cerveza
Sustituto de gluten y procesamiento de masa	Panadería, pastas
Estabilizante	Helados, aderezos, jugos, margarina
Agente de hinchamiento	Productos procesados de carne
Mejorador de estabilidad en la congelación y descongelación	Queso, alimentos congelados
Espesante	Dulces, salsas, jarabes y rellenos de pasteles

Tabla IV: Usos prácticos del xantano en la industria de alimentos.

En la industria petrolera, se utiliza en los lodos de perforación como lubricante y como polímero de inundación para controlar la movilidad del agua en los procesos terciarios de recuperación mejorada del petróleo (Guerrero *et al.*, 1986; Littman, 1988). En la recuperación secundaria de petróleo se adiciona para reducir la permeabilidad y reducir la movilidad del agua al incrementar su viscosidad. Las disoluciones de xantano también se aplican a líquidos de fractura. La fractura hidráulica permite mejorar la productividad del pozo mediante fracturas profundas en el reservorio. La reología del xantano permite una transmisión de presión máxima a la formación y fricción mínima en la tubería y reservorio.

Otros usos industriales son la fabricación de tintas para impresión a chorro, procesos para remoción de metales disueltos en minería y películas termo curables con ventajas medioambientales.

1.6.7. Proceso de producción del xantano.

El proceso típico de producción de xantano es discontinuo (Flores-Candia, 1998; García-Ochoa *et al.*, 2000 b). Comienza con la conservación y el cultivo de la cepa de *X. campestris*. La cepa seleccionada se conserva a largo plazo con métodos como liofilización y congelamiento a fin de mantener sus propiedades. Del cultivo conservado se toma una pequeña cantidad y se hace crecer en medios sólidos o líquidos. Se cultiva en placas de petri, erlenmeyers y fermentadores pequeños hasta obtener el inóculo. El inóculo ingresa en el biorreactor junto con el medio de producción previamente esterilizado. El medio de producción contiene como fuente de carbono sacarosa, glucosa o jarabe de maíz en concentraciones de 20-40 g L⁻¹. También contiene fuentes complejas o inorgánicas de nitrógeno y otros nutrientes en menor cantidad. La fermentación se lleva a cabo en condiciones aerobias, controlándose la temperatura, pH, oxígeno disuelto, formación de espuma y agitación. Al final de la fermentación se separan las células por centrifugación o filtración. El xantano formado se separa típicamente por precipitación con agentes como isopropanol, etanol o acetona, agregado de sales y ajuste de pH. De acuerdo con las regulaciones de la FDA para usos alimenticios, se debe utilizar isopropanol para su precipitación. El agente precipitante se recupera por destilación. El producto precipitado se lava, se seca, muele y envasa. A veces se somete a tratamientos enzimáticos intermedios para modificar sus propiedades (**Fig. 19**).

1.6.8. Variables de proceso.

Un aspecto importante del proceso es la cepa bacteriana. La cepa puede sufrir con el tiempo degradación hacia variantes que no producen xantano si no se utilizan buenas técnicas de conservación (García-Ochoa *et al.*, 2000b). Actualmente existen variedades genéticamente modificadas en las cuales se incrementó la producción de xantano mediante mutaciones o el agregado de información genética exógena que controla la síntesis de xantano.

Se han investigado variedades que utilizan la lactosa como fuente de carbono por inserción de un plásmido con un gen que codifica la enzima β -galactosidasa, pero éstas presentaban problemas de estabilidad en el tiempo. Se aislaron mutantes que producen goma con mayor contenido de piruvato y también sin piruvato. Mediante la ingeniería genética, se estudian modificaciones para eliminar la producción de metabolitos indeseables como las enzimas que degradan la celulosa (Harding *et al.*, 1995).

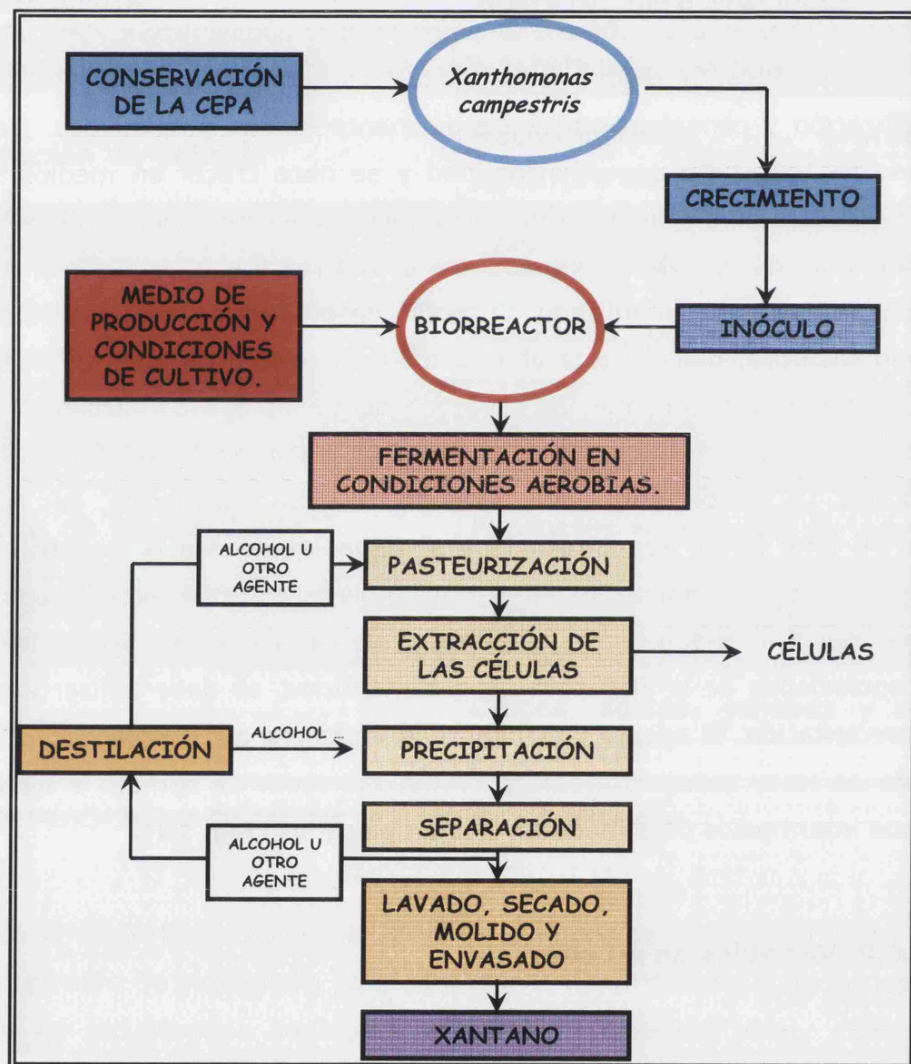


Figura 19: Esquema del proceso de obtención del xantano.

Otro aspecto a controlar es la etapa de generación del inóculo. Se pretende que la producción de xantano sea pequeña ya que el xantano alrededor de las células dificulta el transporte de nutrientes y aumenta el tiempo de la fase de latencia del

crecimiento. Se trabaja en varias etapas en las que se restringe el tiempo de cultivo.

En cada etapa se inocula un 5-10% del volumen total del tanque y se hacen tantas inoculaciones como sean necesarias de acuerdo al volumen del biorreactor de producción (García-Ochoa *et al.*, 1997). El medio de producción debe estar optimizado ya que tiene una gran influencia en el crecimiento y la producción de xantano. Los carbohidratos más utilizados son glucosa o sacarosa, a una concentración de 20 a 40 g L⁻¹, ya que a concentraciones mayores se inhibe el crecimiento bacteriano. Como fuente de nitrógeno se utilizan fuentes orgánicas como por ejemplo extractos de soja o inorgánicas como nitrato de amonio.

La relación carbono/nitrógeno usualmente es más baja en el medio de producción que para el crecimiento y existen discrepancias en cuanto a su efecto sobre el rendimiento y la productividad (Flores-Candia, 1998). El medio también afecta la calidad de la goma; por ejemplo, el grado de sustitución por piruvato y acetato depende de la concentración de los micronutrientes. Además de la operación discontinua o *batch*, autores como Funahashi *et al.* (1987) han estudiado la modalidad *fed-batch*, en la cual la fuente de carbono se agrega gradualmente. Esto permite mantener el nivel de glucosa entre 30 y 40 g L⁻¹, lo cual es óptimo para la producción de xantano.

La aplicación industrial de la modalidad *fed-batch* no ha prosperado debido a que el incremento de la producción es pequeño y al final del proceso queda una gran cantidad de glucosa remanente (Flores-Candia, 1998). Otra modalidad propuesta es la fermentación continua. Con ella se han alcanzado las mayores productividades específicas conocidas. Lamentablemente, la fermentación continua presenta problemas prácticos a escala industrial. Por una parte es difícil el mantenimiento de la esterilidad, pudiendo aparecer mutantes de rápido crecimiento que no producen xantano.

Otro problema es que en el medio de cultivo queda una gran cantidad de carbohidrato sin utilizar, lo cual perjudica la economía del proceso y dificulta la separación posterior. En cuanto al pH, el control para mantenerlo en el óptimo de 6,8-7 mejora el crecimiento pero inhibe la producción de goma una vez alcanzada la fase estacionaria. Si se trabaja sin control de pH se logra mayor producción de goma, ya que ésta continúa produciéndose durante la fase estacionaria (García-Ochoa *et al.*, 2000b). Una variable de suma importancia es el suministro adecuado de oxígeno. Las células lo requieren tanto para el crecimiento como para la producción. Los reactores más usuales son tanques agitados con difusor de aire. Al progresar la fermentación, se produce un incremento de viscosidad que tiende a reducir la velocidad de transferencia de oxígeno.

La transferencia de oxígeno puede controlarse modificando la velocidad de agitación y el caudal de aire. Si se usa una excesiva velocidad del agitador, se producen daños mecánicos a las células. Se logra un compromiso entre la transferencia de oxígeno y los daños a las células aumentando gradualmente la velocidad de agitación a lo largo de la fermentación. El control de espuma se hace necesario ya que el cultivo tiende a formarla ante la intensa aireación. La generación incontrolada de espuma provoca pérdidas de medio de cultivo a través de la salida de gases y para controlarla se agregan pequeñas cantidades de antiespumantes. La temperatura del proceso es una variable que afecta la velocidad de todas las etapas bioquímicas y los fenómenos de transporte de nutrientes, metabolitos y oxígeno. Influye por tanto en la cinética neta del crecimiento celular y la producción de xantano, lo que en última instancia determina el rendimiento y los tiempos de fermentación.

1.6.9. *Xylella fastidiosa*.

Xylella fastidiosa es una bacteria fitopatógena, limitada al xilema y causante de un amplio rango de enfermedades en plantas, produciendo graves consecuencias económicas. *Xylella fastidiosa* es la causante de la clorosis variegada de los cítricos (CVC). Fue detectada esta enfermedad por primera vez en Brasil en el año 1987. Los frutos afectados son de pequeño tamaño, duros y sin valor comercial (Rosseti, *et al.*, 1990). Actualmente el control de la enfermedad (CVC), se limita a la poda de los brotes infectados, la aplicación de insecticidas y el uso de plantas sanas para huertos nuevos.

Además de CVC, otras cepas de *X. fastidiosa* causan un amplio rango de enfermedades en plantas económicamente importantes, incluyendo la enfermedad del taladro de la vid, enanismo de la alfalfa, quemadura de la hoja del ciruelo, y también causa enfermedades en mora, perales, almendros, olmo, roble, arce y café, entre otros (Chang *et al.*, 1993).

1.6.9.1. Las proteínas involucradas en transporte

Los sistemas de transporte son los componentes principales en la relación hospedador y agente patógeno. Hay un número elevado de transportadores de iones y transportadores para los carbohidratos, aminoácidos, péptidos, nitrato/ nitrito, sulfato, fosfato y vitamina B12 (**Fig.20**). Se conocen cinco receptores externos de membrana, todos ellos asociados al transporte de hierro. Los complejos excitadores, TonB – ExbB – ExbD y TolA – TolR – TolQ, son esenciales para el funcionamiento de los receptores exteriores de la membrana. En total, 67 genes codifican las proteínas involucradas en el metabolismo del hierro. El genoma de *X. fastidiosa* codifica una batería de proteínas que median la inactivación de drogas y desintoxicación, la alteración de blancos potenciales de droga, prevención de entrada de droga y extrusión activa de drogas y toxinas. Éstos incluyen los transportadores ABC y los procesos de transporte conducidos por un gradiente de protones (Paulsen *et al.*, 1998).

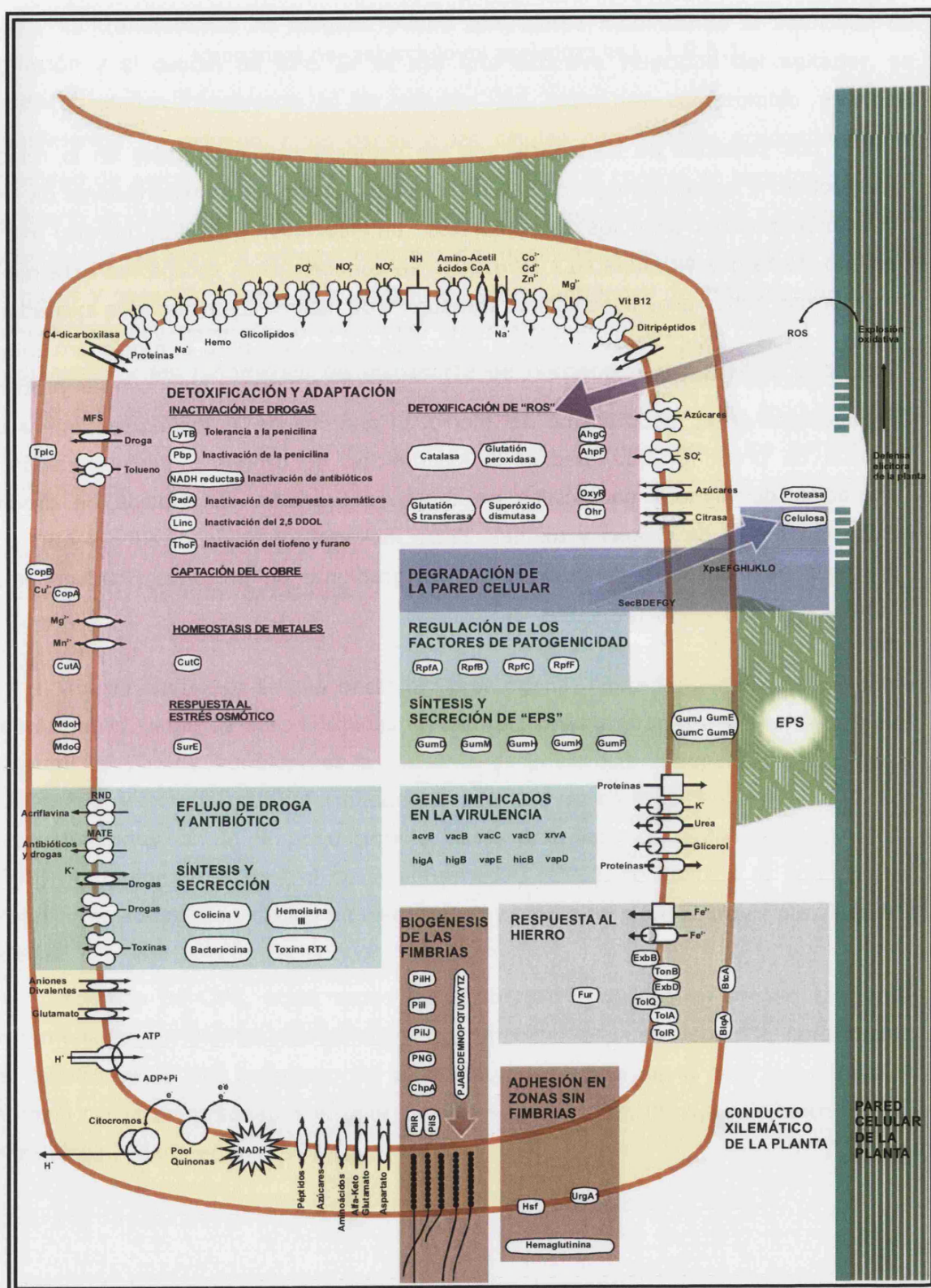


Figura 20: Esquema representativo del proceso bioquímico que involucra a *Xylella fastidiosa* en la patogenicidad y supervivencia en el xilema del hospedador.

(Figura 20): En este esquema se representan en **negrita** las principales categorías funcionales, los genes bacterianos y los productos relacionados con dicha función quedan englobados dentro de cada sección parcializada perteneciendo al encabezamiento remarcado en **negrita**. Los transportadores están representados por cilindros, canales; Los óvalos representan a los transportadores secundarios, incluyendo a la familia MFS; las alteras pareadas representan los transportadores secundarios responsables de la extrusión de droga; las alteras triples se corresponden con los transportadores ABC; el icono con forma de bombilla se corresponde con la ATP sintasa de tipo F; los cuadrados son otros transportadores.

Los iconos con dos flechas representan los sistemas de simporte y antiporte (transportadores de H^+ o Na^+ , a menos que se indique de otra manera). El 2,5 DDOL (2,5-dicloro-2,5ciclohexadieno-1,4-dol); las siglas EPS (representan los exopolisacáridos); MATE representa a la familia multi-antimicrobiana de extrusión de los transportadores multidroga responsables del eflujo del gen XF2686; MFS representa al facilitador principal de la familia de transportadores; Pbp representa a la β -lactamasa de tipo penicilina unida a proteína (XF1621). RND, representa a la superfamilia de transportadores involucrados en la resistencia y nodulación celular; ROS, especies reactivas al oxígeno.

1.6.9.2. Adhesión.

X. fastidiosa está generalmente embebida en una matriz translúcida extracelular en la planta. Se producen acumulaciones de bacterias dentro de los vasos xilemáticos, causando una obstrucción que se traduce en un estrés hídrico para la planta, produciéndose enrollamiento de las hojas (Chagas *et al.*, 1992). Del análisis de la secuencia completa del genoma, se puede deducir que la matriz está compuesta de polisacáridos extracelulares (EPSs) sintetizados por enzimas íntimamente relacionadas con las de la bacteria *X. campestris* pv *campestris* (Xcc) que producen el ya mencionado xantano (Tang *et al.*, 1991).

Comparado la secuencia génica de *X. fastidiosa* con Xcc, sin embargo, no se detecta el gen *gumI* (que codifica la proteína glicosiltransferasa V, que incorpora la manosa terminal), ni el gen *gumL* (codificando la cetolasa, la cual incorpora el piruvato al polímero) o el gen *gumG* (codificando una acetiltransferasa que adiciona el acetato), por lo que se puede deducir que el xantano producido por *X. fastidiosa*

es menos viscoso que el producido por el género *Xanthomonas*. La estructura básica del polisacárido producido por *X. fastidiosa* es la de un tetrámero, altamente repetido.

El tetrasacárido estaría ensamblado por la adición secuencial de UDP-glucosa, UDP glucosa, UDP-manosa y ácido UDP-glucurónico (Rodrigues *et al.*, 2001) (**Fig. 21**).

La regulación positiva de la síntesis de enzimas extracelulares y de EPS_s en *Xanthomonas* es llevado a cabo por proteínas codificadas por el rpf (factor de regulación de patogenicidad) del cluster. Las mutaciones en cualquiera de estos genes en *Xanthomonas* producen una inhibición en la síntesis de los EPS. Como consecuencia, la cepa salvaje se convierte en una cepa no patógena tras la mutación. *X. fastidiosa* contiene genes que codifican RpfA, RpfB, RpfC y RpfF, sugiriendo que ambas bacterias pueden regular la síntesis de factores de patogenicidad de los EPS a través de mecanismos similares (Tang *et al.*, 1991).

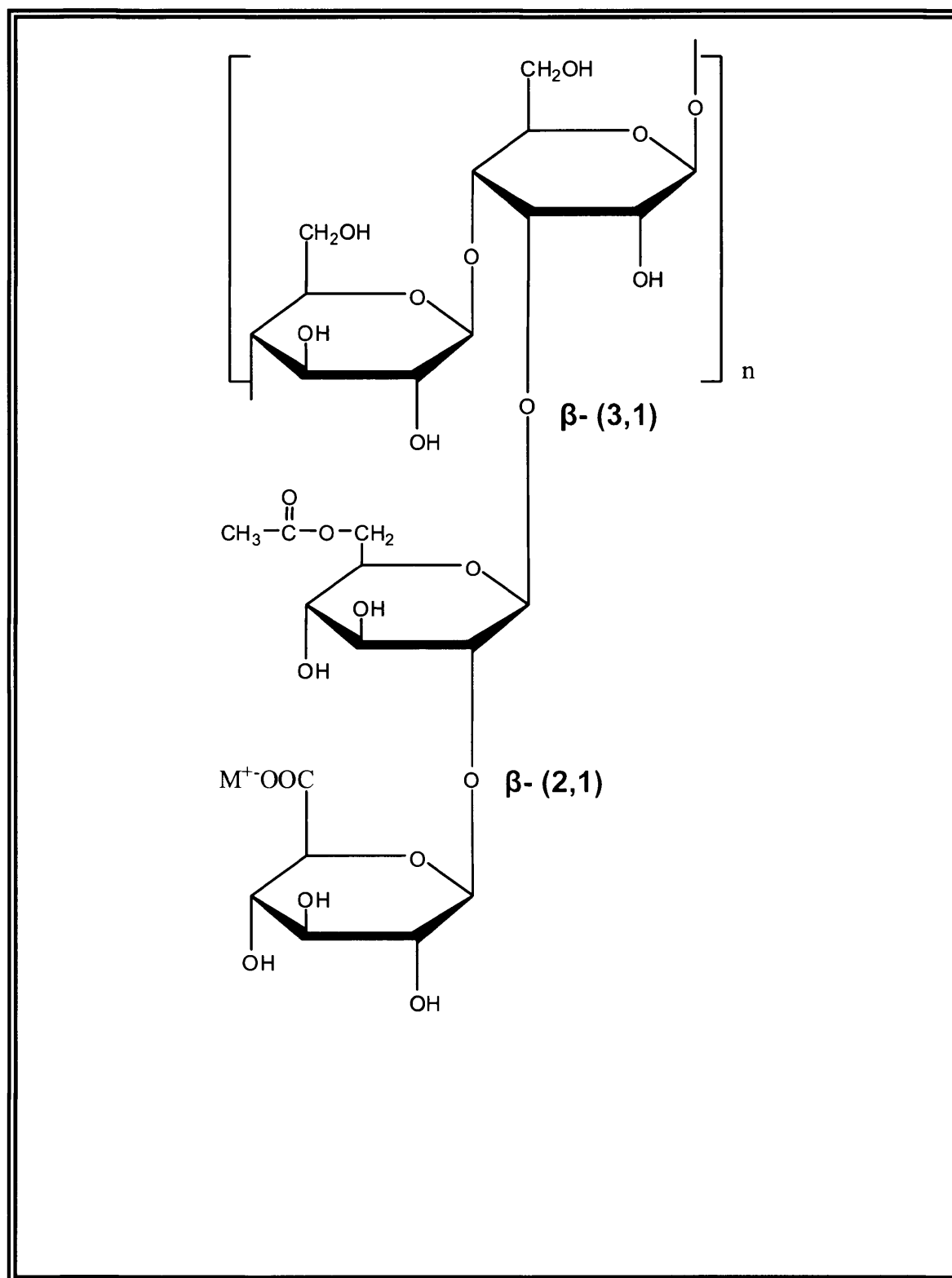


Figura 21: Estructura del xantano de *Xylella fastidiosa*. $M^+ = Na, K$ o $\frac{1}{2} Ca$.

Las fimbrias que posee la bacteria son fácilmente detectables mediante microscopía electrónica de la bacteria alojada en la planta o en el insecto que actúa como vector. Se cree que las fimbrias están involucradas en las interacciones planta-

bacteria y en las interacciones bacteria-bacteria durante el proceso de colonización del xilema. Además de los EPS, las fimbrias juegan un papel decisivo en la entrada de la bacteria y adhesión a las paredes del xilema (Raju y Wells, 1986; Fernandez y Berenguer, 2000).

1.6.9.3. La migración entre vasos conductores.

El movimiento de la bacteria en los vasos del xilema es determinante para la colonización efectiva de la planta. Para que esto ocurra, es necesario que se produzca cierta degradación de las paredes de los vasos xilemáticos. De las enzimas hidrolíticas capaces de llevar a cabo dicha función, se destaca un precursor de la poligalacturonasa y una celulasa.

1.6.9.4. La toxicidad.

Los miembros de la familia de toxinas Repeats Toxin (RTX), son un grupo de toxinas producidas por bacterias Gram negativas de distintas especies como las *Xanthomonadaceae*. Se trata de citolisinas formadoras de poros con gran variedad de células y huéspedes blanco de acción. En *X. fastidiosa* se han identificado cinco genes para la hemolisina: Haemolisina III (XF0175), que pertenece a una familia proteica todavía sin caracterizar y otros cuatro (XF0668, XF1011, XF2407, XF2759) que pertenecen a la familia de la toxina RTX. Uno de estos ORFs (Open Reading Frame) está estrechamente relacionado con la bacteriocina y la toxina RTX, que también ha sido encontrada en plantas que contienen la bacteria *Rhizobium leguminosarum* (Rahme *et al.*, 1995; Oresnik *et al.*, 1999; Lally *et al.*, 1999; Harvarstein *et al.*, 1994).

Hay dos colicinas-V que son precursoras de proteínas. El aparato necesario para la biosíntesis de colicina y su secreción está también presente. Estos genes están dispersos en el cromosoma bacteriano (Harvarstein *et al.*, 1994). En definitiva, *X. fastidiosa* produce un nuevo exopolisacárido (EPS), diferente al de *X. campestris* y semejante al de *X. albilineans* (descrito más adelante). *X. fastidiosa* tiene todos los genes necesarios para sintetizar los compuestos intermediarios requeridos en la síntesis de este nuevo EPS (Hassler y Doherty, 1990). El exopolisacárido segregado por esta bacteria está directamente relacionado con la patogenicidad de la misma. Este EPS podría estar involucrado en la formación de un "biofilm" necesario para el acercamiento y supervivencia de las bacterias en los dos ambientes

hidrodinámicamente turbulentos en los que se encuentra: los vasos xilemáticos y las bombas absorbentes de los insectos vectores.

La inhibición de la producción de EPS impediría que la planta desarrolle los síntomas típicos de la enfermedad y también afectaría a la dispersión de la misma (Dow *et al.*, 2000).

1.7. XANTANO DE *Xanthomonas albilineans*.

La bacteria *X. albilineans*, causante de la escaldadura foliar en la caña de azúcar, ha sido descrita en apartados anteriores. El patógeno está confinado en los haces vasculares de tallo y hojas de la planta, los cuales están a menudo parcialmente ocluidos, preferentemente los haces floemáticos y las células mesofílicas vecinas, con una sustancia de aspecto gelatinoso o gomoso (Martin y Robison, 1961) (**Fig. 22**).

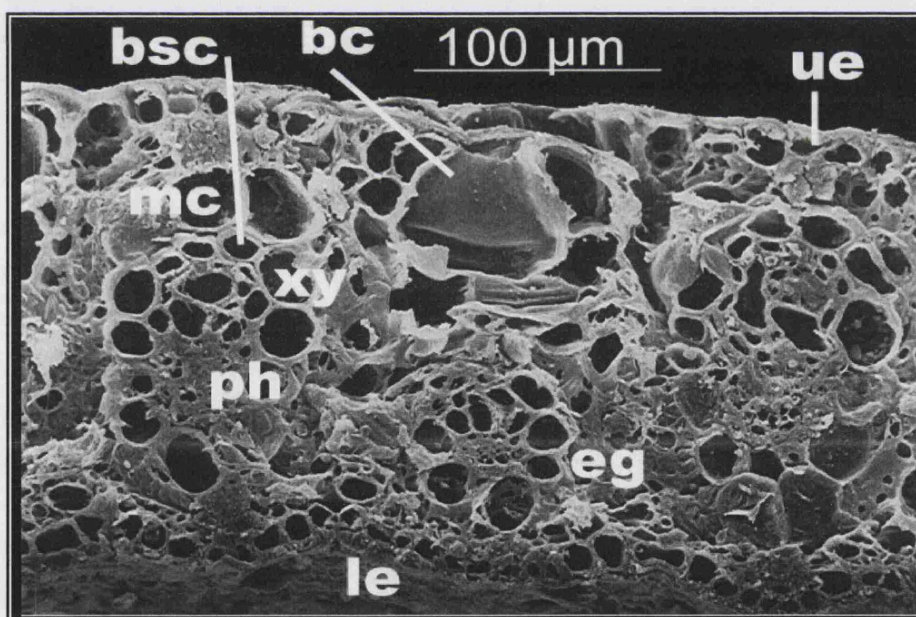


Figura 22. Ampliación de una sección transversal de hoja enferma de caña de azúcar mostrando depósitos de exudado gomoso (eg) que obtura los elementos floemáticos (ph) mientras que las células del mesófilo (mc) que ocupan la capa inmediatamente adyacente a la epidermis adaxial (ue) y las de la vaina (bsc), así como los grandes elementos xilemáticos (xy) no contienen aparentemente material de relleno. La epidermis abaxial (le) muestra un relieve muy regular.

En algún caso, las paredes celulares de los elementos xilemáticos invadidos se desintegran formando cavidades lisigénicas, llenas de goma y restos celulares.

Este exudado de tipo gomoso invade completamente los tejidos foliares correspondientes a las líneas cloróticas de las hojas enfermas (**Fig. 23**).

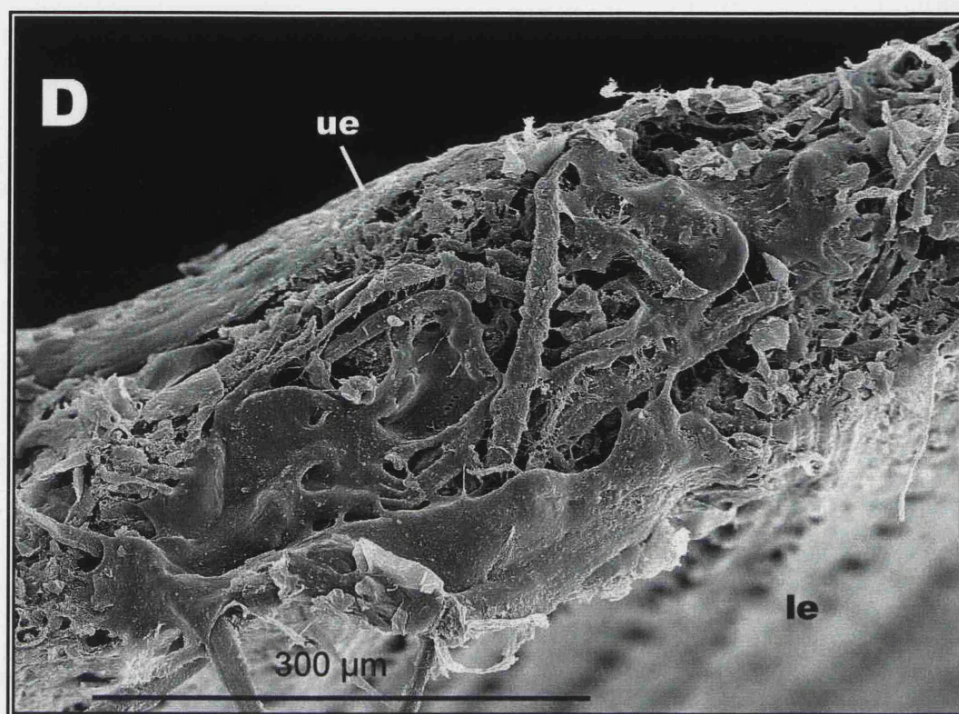


Figura 23. Una vista general del corte transversal de una hoja enferma de caña de azúcar completamente ocupada por grandes masas de exudado gomoso que enmascara toda la estructura interna foliar.

Grandes depósitos gomosos rodean las células mesofílicas y ejercen presión mecánica sobre las células buliformes hasta provocar la deformación de sus paredes. Tanto los vasos floemáticos como xilemáticos aparecen completamente cegados por este producto, formando visibles cavidades lisigénicas. Incluso en algunos puntos pueden verse enormes depósitos gomosos que sobresalen de los tejidos invadidos, ocupando la totalidad de los espacios intercelulares y alterando por completo la estructura foliar (**Fig. 23**) (Wallis *et al.*, 1973; Hugouvieux *et al.*, 1998; Solas *et al.*, 2003).

Este exudado gomoso que se ha identificado como xantano y del que se tratará con más detalle a lo largo de esta Tesis, difiere en su estructura del xantano producido por *X. campestris* y es muy similar al exopolisacárido producido por *X. fastidiosa*. El xantano de *X. albilineans* está formado por un tetrámero basal constituido por dos restos de glucosa, uno de manosa y uno de ácido glucurónico que se repite sucesivas veces para formar la macromolécula (Solas *et al.*, 2003) (**Fig.24**).

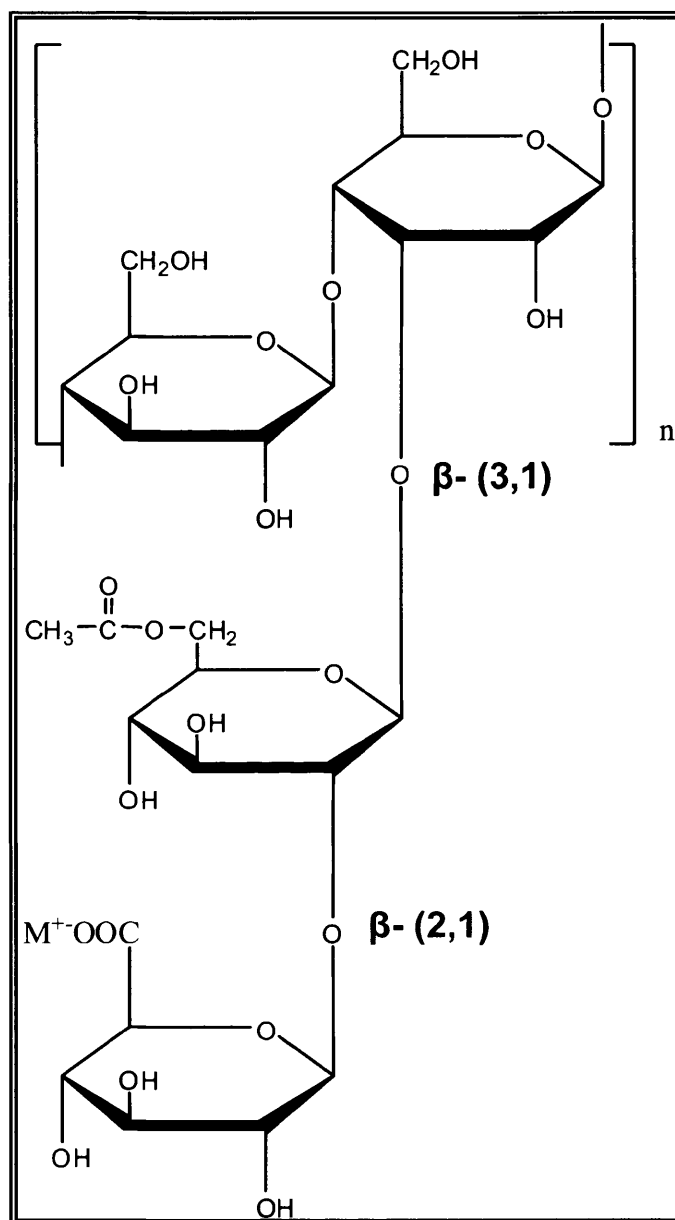


Figura 24. Estructura del xantano de *Xanthomonas albilineans*. $M^+ = Na, K$ o $\frac{1}{2} Ca$.

1.8. UDP-Glucosa Deshidrogenasa.

La existencia de restos glucuronato en los exopolisacáridos mencionados en el apartado anterior requiere de la acción de una uridina difosfoglucosa deshidrogenasa (**UDPG-dh**). Esta enzima, necesaria por tanto para la producción del xantano de *X. albilineans*, va a ser el objetivo principal de estudio de esta tesis. En este apartado se van a tratar conceptos generales de esta enzima, presente en otros muchos organismos. Los heteropolisacáridos pertenecen a la compleja familia de los

carbohidratos. Están constituidos por cadenas de al menos veinte residuos de monosacáridos y de al menos dos tipos diferentes.

Una cierta cantidad de heteropolisacáridos contienen ácido glucurónico (**GlcA**) como uno de sus principales constituyentes. El precursor monomérico del residuo ácido glucurónico en el polisacárido es el ácido UDP-glucurónico (**UDP-GlcA**). En la **Fig.25** se representa de forma esquemática el proceso de biosíntesis de la UDP-glucosa (**UDPG**), UDP-galactosa y UDP-GlcA.

UDP-GlcA es producido por la acción de la enzima (UDPG-dh), la cual está presente en muchas formas de vida. Debido a las diferentes características de las UDPG-deshidrogenasas, ha sido propuesta como una enzima clave en la biosíntesis de heteropolisacáridos. UDPG-dh cataliza la oxidación, dependiente de NAD^+ , de UDPG a UDP-GlcA. Esta enzima fue purificada por primera vez en el año 1954 a partir de hígado de conejo de Indias. Más tarde, en el año 1957, fue purificada a partir de plántulas de guisante (Strominger *et al.*, 1954; Strominger *et al.*, 1957). Desde entonces ha sido detectada en un amplio rango de especies, desde los virus hasta el hombre. La isoforma bacteriana de la enzima fue cristalizada en el año 2000. La caracterización fue llevada a cabo en formas nativas y mutadas para la enzima a un nivel de 2,0 Å (Campbell *et al.*, 2000). El cDNA y el gen para esta enzima han sido clonados a partir de varias especies y la localización cromosómica del gen ha sido mapeada en humanos y ratones (Marcu *et al.*, 1999; Spicer *et al.*, 1998).

Se cree que la enzima tiene una única copia del gen que la codifica en el genoma humano, mientras que en *Arabidopsis thaliana* tiene 4 genes y todos ellos están expresados (Reter *et al.*, 2001). En *Bacillus subtilis* existen dos genes que codifican para la UDPG-dh (Mijakovic *et al.*, 2003). La enzima no tiene una parte transmembrana y es citosólica. Sin embargo, las UDPG-deshidrogenasas bacterianas y de hongos han sido descritas como enzimas particulares por estar asociadas a la membrana (Griffith *et al.*, 2004; Rigg *et al.*, 1998).

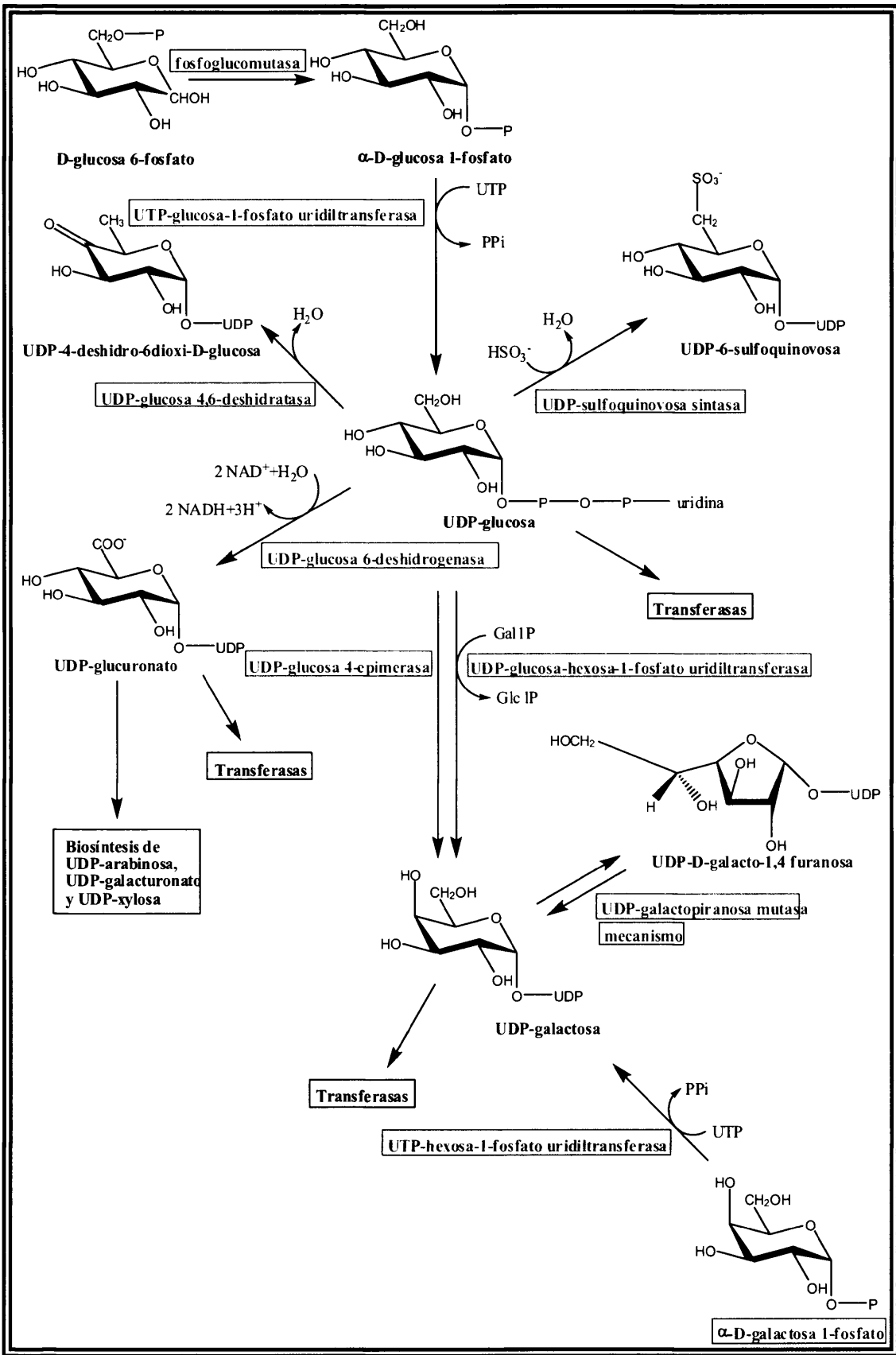


Figura 25: Biosíntesis de UDP-glucosa, UDP-galactosa y ácido UDP-glucurónico.

La enzima pertenece a un pequeño grupo de deshidrogenasas que son capaces de llevar a cabo la doble oxidación de una función alcohol a ácido sin liberación del aldehído intermediario (Campbell *et al.*, 1997). Esta enzima tiene un amplio rango de funciones. En plantas, UDPG dh es la enzima principal en rutas de biosíntesis de hemicelulosas y pectinas, componentes de paredes celulares. En el caso de las bacterias patógenas, como son las especies de *Xanthomonas*, la enzima estaría relacionada con la virulencia de la correspondiente cepa productora (Kai-Wei *et al.*, 2001).

Los nucleótidos de azúcar son compuestos ricos en energía, lo que significa que su producción es altamente costosa para la célula. Por ello, es vital que tales compuestos sean correctamente dirigidos hacia los centros en los que son requeridos, evitando cualquier eliminación no deseada de los mismos. Se ha sugerido que la enzima UDPG-dh es una enzima reguladora o limitante en el control de la biosíntesis de polisacáridos en plantas y animales (De Luca *et al.*, 1976; Hickery *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 1995). Por ello, su velocidad de producción no debe ser gobernada primariamente por la cantidad de sustrato sino por una actividad regulada por varios factores. Estos incluyen la cantidad de enzima así como modificaciones covalentes o alostéricas de la proteína (Nelson y Cox, 2000; Smith *et al.*, 1997; Wegrowki *et al.*, 1998).

La idea de que la enzima UDPG-dh tenga un papel regulador está basada en varias observaciones. Dicha enzima, tiene una posición crucial y además es nexo de unión en el metabolismo común de UDP-GlcA. La reacción catalizada por esta enzima es irreversible y su actividad depende, entre otros parámetros, de su concentración (Jaenicke *et al.*, 1986). Además, esta enzima es retroinhibida por su producto final, UDP-GlcA, y su cofactor, NADH (Ordman *et al.*, 1977), así como el producto siguiente, UDP-xilosa (Gaine y Phelps, 1972; Neufeld y Hall, 1965). Adicionalmente, se ha comprobado que la expresión de UDPG-dh incrementa en respuesta a la interleuquina 1 β (una citoquina inflamatoria). De este modo, la suma de factores adicionales de regulación puede influir en la actividad enzimática de UDPG-dh (Spicer *et al.*, 1998). Recientemente se han descrito tirosinas-quinasa que fosforilan UDPG-deshidrogenasas bacterianas. La fosforilación de UDPG-dh, observada tanto en bacterias gram-negativas como en gram-positivas, parece activar a dicha enzima y abre paso a algún otro mecanismo regulador (Grangease *et al.*, 2003; Mijakovic *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción de la enzima UDPG-dh ha sido ampliamente estudiado durante los años setenta y ha sido propuesto por tratarse de un mecanismo del tipo “*bi-uni-uni-pingpong*” (Campbell *et al.*, 1997); en humanos, la reacción catalizada por dicha enzima es llevada a cabo de la siguiente forma:

Primero, el sustrato, UDPG, y luego la coenzima, NAD^+ , se unen a la enzima. En la primera parte de la reacción, la UDPG es oxidada a una aldimina intermediaria y el NAD^+ es reducido a NADH y liberado. Después de esto, una segunda molécula de NAD^+ se une a la enzima, y se reduce a NADH, mientras el tiohemiacetal es oxidado a tioéster antes de la liberación del ácido UDP-GlcA.

UDP-GlcA es liberado después de que la segunda molécula de NADH haya sido separada de la enzima (**Fig. 26**). Igualmente, las UDPG-deshidrogenasas en las plantas parecen funcionar con el mismo orden de secuencia, tal y como queda explicado en el estudio hecho en caña de azúcar por Turner y Botha (2002).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la bacteria *X. campestris* produce un xantano que va a requerir la presencia de la enzima UDPG-dh. El gen *udgH* de *X. campestris* codifica para la enzima UDPG-dh. Este gen juega un papel determinante en la patogenicidad de la bacteria y está directamente involucrado en el proceso de síntesis del xantano.

Mutaciones en el gen *udgH* en *X. campestris pv. campestris* y *X. campestris pv. vesicatoria*, agente causal del moteado de la hoja en pimienta y tomate, producen una pérdida de virulencia (Chang *et al.*, 2001).

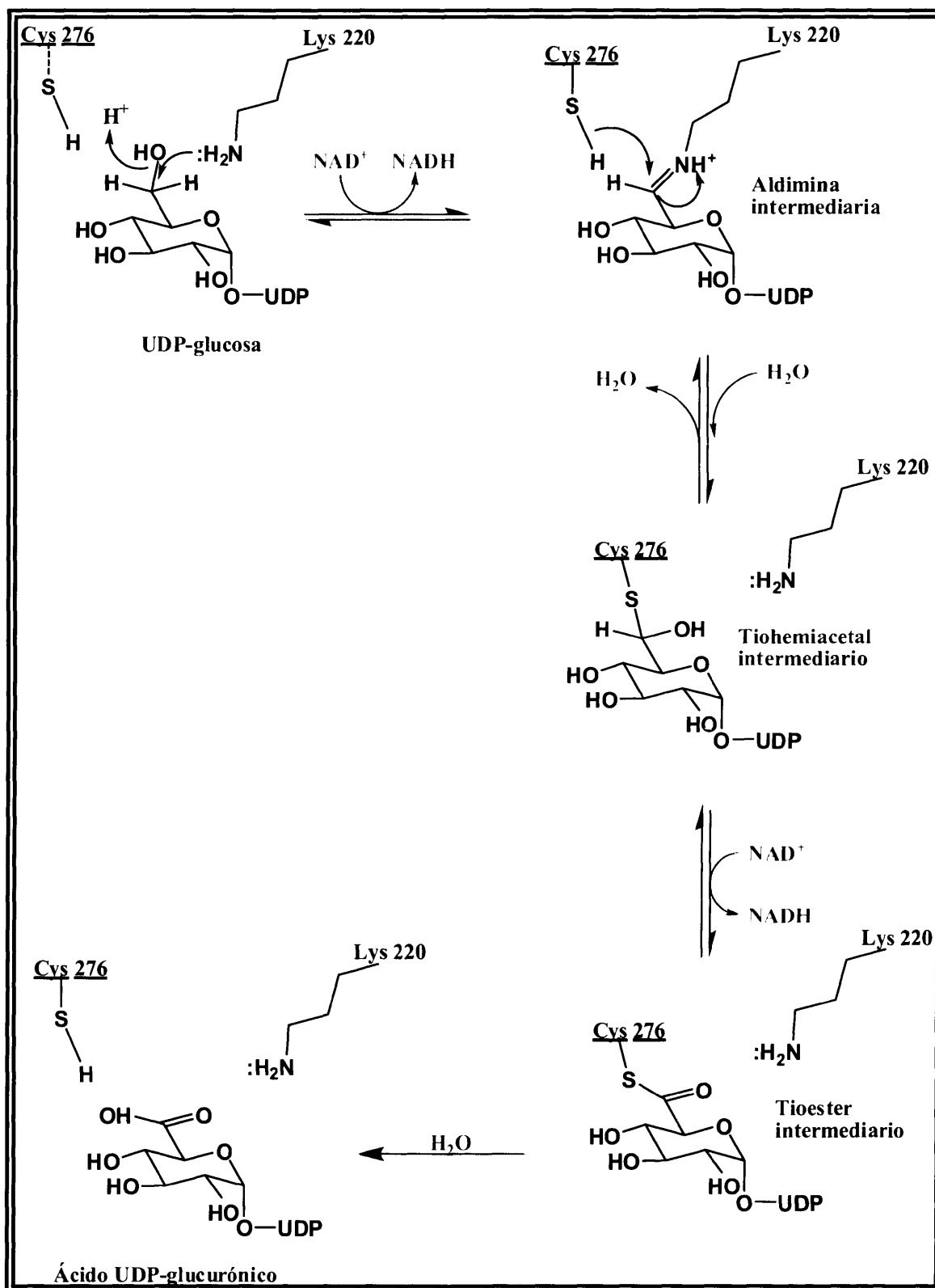


Figura 26: Mecanismo de acción de la UDP-glucosa deshidrogenasa en humanos.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo han sido los siguientes:

- Purificación y propiedades de la enzima UDPglucosa deshidrogenasa (UDPG-dh) procedente de la bacteria *X. albilineans*.
- Papel de las glicoproteínas de caña de azúcar en la síntesis de la enzima UDPG-dh.
- Estudio del xantano producido por *X. albilineans* tras la inoculación de tallos de caña de azúcar.
- Alteraciones del proceso de cristalización de la sacarosa en jugos de caña de azúcar producidas por el xantano bacteriano

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Durante este trabajo de investigación se ha utilizado la bacteria *Xanthomonas albilineans*, agente causal de la enfermedad de la escaldadura foliar en la caña de azúcar, cepa NCPPB 887. Dicha bacteria se ha mantenido tras sucesivas resiembras en medio Wilbrink sólido (**Tabla V**). Para la realización de los experimentos y cuando se indique, la bacteria se cultivó en medio Wilbrink líquido (sin agar). La temperatura óptima de crecimiento ha sido de 37 °C y un pH 7,0 (Dye, 1980). El tamaño del inóculo inicial y el incremento en peso seco del cultivo en medios líquidos fue medido por nefelometría siguiendo el incremento de absorbancia a 710 nm (Dong *et al.*, 1994).

El material vegetal utilizado en el presente trabajo ha sido caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) procedente del cultivar Barbados 42-231, altamente susceptible a la enfermedad de la escaldadura foliar, cultivada en el invernadero del Real Jardín Botánico Alfonso XIII (Universidad Complutense de Madrid) durante un periodo de tiempo de 9,12 ó 22 meses según el experimento a realizar. (**Fig. 27**).



Figura 27: Plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) del cultivar Barbados 42-231, crecidas en el invernadero del Real Jardín Botánico Alfonso XIII (Universidad Complutense de Madrid).

3.2. OPTIMIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE LA UDP-Glucosa deshidrogenasa.

Con la finalidad de averiguar el día de máxima producción de la enzima, se procedió a realizar diferentes modificaciones en la fuente de carbono del medio Wilbrink original (Dye, 1980) (**Tabla V**). Se llevaron a cabo tres ensayos: en el primero, la fuente de carbono fue sacarosa 58 mM; en el segundo ensayo se sustituyó la sacarosa por glucosa a la misma concentración, y en el tercero la fuente de carbono fue sacarosa 24 mM y glucosa 24 mM.

Volúmenes de 250 mL de cada medio fueron inoculados con 20 mg de peso seco de la bacteria *X. albilineans* e incubados a 37°C. Diariamente, el contenido de los matraces fue centrifugado a 10.000 x g durante 20 min a 2°C. Posteriormente, el precipitado fue resuspendido en 5,0 mL de acetona para la deshidratación de la bacteria. La mezcla se secó en corriente de aire hasta eliminar toda la acetona. El residuo sólido obtenido tras el secado se resuspendió en 5,0 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8 conteniendo un "cocktail" inhibidor de proteasas (Sigma Chemical Co.) y cuando se indique se adicionaron 2,0 mL de AMP cíclico (AMPC) a una concentración 0,5 mM. Posteriormente, la mezcla se centrifugó en las mismas condiciones anteriores y en este sobrenadante se midió la concentración de proteínas mediante el método de Warburg & Christian, (1941) y se llevó a cabo el ensayo de actividad enzimática de la UDPG-dh.

COMPONENTE	CANTIDAD PARA UN VOLUMEN FINAL DE 1 L.
PEPTONA BACTERIOLÓGICA	5,0 g
SACAROSA (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	20,0 g
FOSFATO MONOPOTÁSICO (KH ₂ PO ₄)	0,5 g
SULFATO MAGNÉSICO 7-HIDRATO (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,25 g
AGAR BACTERIOLÓGICO (SÓLIDO)	15,0 g

Tabla V: Componentes del medio Wilbrink sólido original para el cultivo de *Xanthomonas albilineans*.

3.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA UDPG-deshidrogenasa.

Para el ensayo de la actividad UDPG-dh se preparó una mezcla de reacción que contenía 0,5 mL del sobrenadante anterior (citado en el último párrafo del apartado de Material y Métodos 3.2), 0,5 mL de UDPG 10 mM disuelta en tampón fosfato sódico 10 mM pH 6,8, 0,1 mL de NADPH a una concentración de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, y 1,9 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8.

El control contenía 0,5 mL de sobrenadante, 0,1 mL de NADPH ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) y 2,4 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8. **(Fig.28)**. Cada mezcla se mantuvo a 37°C durante 30 min en un baño a 37°C suministrando O_2 y se midió la oxidación del NADPH por descenso de la absorbancia a 340 nm. Una unidad de actividad específica se definió como $1,0 \text{ mg}$ de NADPH oxidado mg^{-1} proteína min^{-1} . Para un nuevo ensayo de actividad, se cultivó la bacteria en 250 mL de medio Wilbrink líquido a los que se adicionaban 2,0 mL de AMPc 0,5 mM, procediéndose como en el caso anterior.

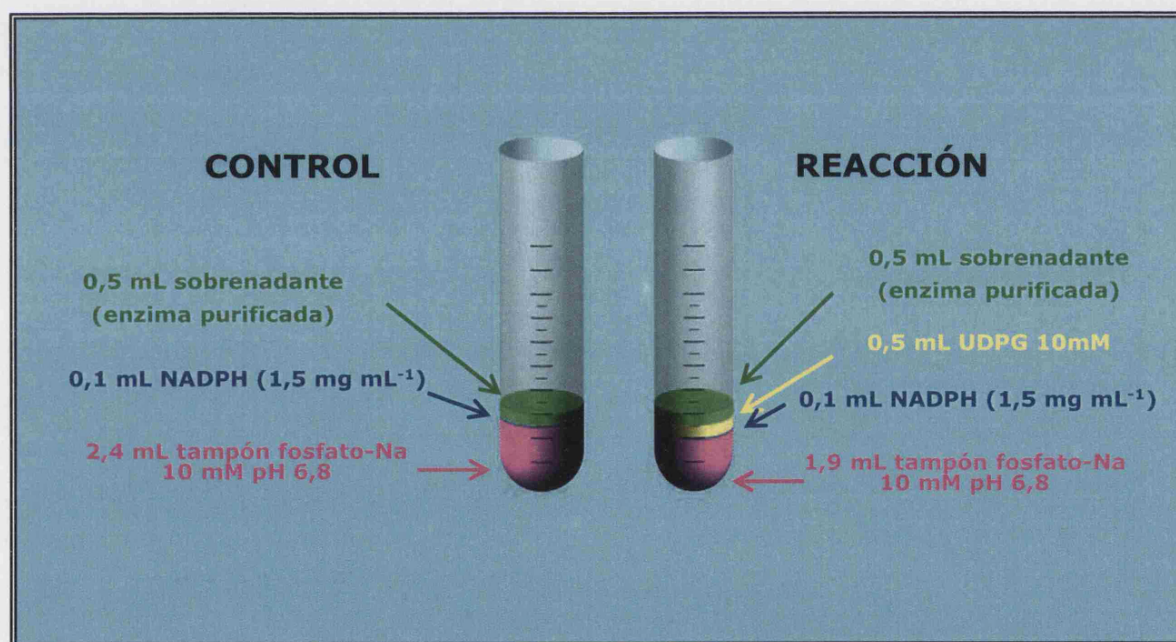


Figura 28: Esquema representativo del ensayo de medida de la actividad de la enzima UDPG-deshidrogenasa.

Una vez determinado el día de máxima producción de la enzima, se fraccionó dicho día en intervalos de 3 h para detectar el punto de máxima producción. Para ello, 250 mL de medio Wilbrink líquido, conteniendo 2,0 mL de AMPc 0,5 mM, fueron inoculados con 20 mg de peso seco de *X. albilineans* e incubados a 37°C .

Al contenido de dos matraces (uno con y otro sin AMPc) se le aplicó cada 3 h el protocolo anteriormente citado para la obtención del sobrenadante, en el cual se valoró la concentración de proteínas mediante el método de Warburg & Christian (1941) y se midió la actividad de la enzima UDPG-dh según se explica en este mismo apartado en líneas anteriores.

3.4. PURIFICACIÓN DE LA UDPG-deshidrogenasa.

Para purificar la enzima, se prepararon 2 matraces de 250 mL de medio Wilbrink líquido; cada uno de ellos se inoculó con 20 mg de peso seco de *X. albilineans*, y se mantuvieron durante 24 h a 37°C, tiempo estimado como el máximo de producción de la enzima UDPG-dh. Pasado este tiempo, se aplicó el protocolo anteriormente citado (en el apartado de Material y Métodos 3.2) y el sobrenadante obtenido se precipitó con sulfato amónico, primero a un 40% (p/v) de saturación. La mezcla se mantuvo a 4°C durante una hora. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a 2°C. El precipitado obtenido se desechó y el sobrenadante fue nuevamente precipitado con sulfato amónico al 60% (p/v). El sobrenadante obtenido tras centrifugación se desechó y el precipitado obtenido fue resuspendido en 5,0 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, y posteriormente fue dializado. 24 mL del precipitado correspondiente a 24 h fueron dializados a 4°C en oscuridad, hasta la total eliminación del sulfato amónico. Tras la diálisis, se valoró actividad específica de la enzima según lo descrito en el apartado 3.3 de Material y Métodos.

Posteriormente, 10 mL del sobrenadante obtenido tras la diálisis se filtraron a través de una columna de Dowex (8% cross-linked, dry mesh, 200-400), cargada positivamente con 100 mL de ácido clorhídrico 1N, y la proteína se eluyó con tampón fosfato sódico 10 mM, pH de 6,8, conteniendo cloruro sódico 1,7 mM. Se obtuvieron fracciones de 3,0 mL en las que se valoró el contenido proteico mediante el método de Warburg & Christian (1941) y se midió la actividad enzimática UDPG-dh. En la **Fig.29**, se resume el proceso de purificación de la enzima UDPG-dh.

3.5. SEPARACIÓN DE LA UDPG-deshidrogenasa MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR Y DETERMINACIÓN DE SU pI.

Las dos fracciones de mayor actividad específica obtenidas tras la filtración a través de la columna Dowex, se juntaron obteniéndose un volumen de 6,0 mL. Dicho volumen fue concentrado con un gel concentrante (Spectra Gel Absorbent) hasta llegar a un volumen de 0,5 mL. Este volumen fue repartido en alícuotas de 100 µL cada una y fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización. A continuación se eliminó el agua de las mismas mediante liofilización a una temperatura -80°C y una presión de vacío de 10^{-2} mbares. Para ello se utilizó un liofilizador Testlar Cryodos con una bomba de vacío acoplada Varian DS 102. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización (**Fig. 29**). Previamente a la separación por Electroforesis Capilar, las muestras fueron resuspendidas en 100 µL de tampón borato sódico 10 mM, pH 9,15.

3.5.1. Acondicionamiento del capilar y condiciones de análisis.

El aparato utilizado fue un equipo de Electroforesis Capilar Spectraphoresis 500 de Spectra Physics, equipado con un integrador SP 4290 (Spectra Physics). La detección *on-line* fue realizada por medida de la absorbancia a 200 nm y 280nm. Se utilizaron capilares de sílice fundida recubiertos de poliimida (Scientific Glass Engineering, Milton Keynes, UK) de 70 cm longitud total, 63 cm de longitud de separación, 75 µm de diámetro interno y 190 µm de diámetro externo. Como electrolito se utilizó tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2 (Legaz y Pedrosa, 1993). Se introdujo el capilar en un cassette para facilitar su manejo y para controlar las condiciones de temperatura en caso necesario. El capilar se acondicionó con una secuencia de varios lavados a 60°C. Un primer lavado con NaOH 1N durante 10 min a 60°C, a continuación, un lavado con NaOH 0,1 N durante 30 min y un último lavado con agua Mili-Q durante 30 min a 60°C. El capilar se equilibró lavando con tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2, durante 30 min a 25°C y finalmente con el mismo tampón durante 30 min a 25 °C, aplicando un voltaje inferior a 15 kV. La regeneración de la superficie del capilar entre separaciones fue llevada a cabo mediante lavados en las siguientes secuencias: NaOH 0,1M durante 5 min, agua Mili-Q durante 5 min y tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2, durante 15 min. Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 11 Kv aplicado de tal forma que la migración de los compuestos iónicos se producía desde el ánodo hasta el cátodo.

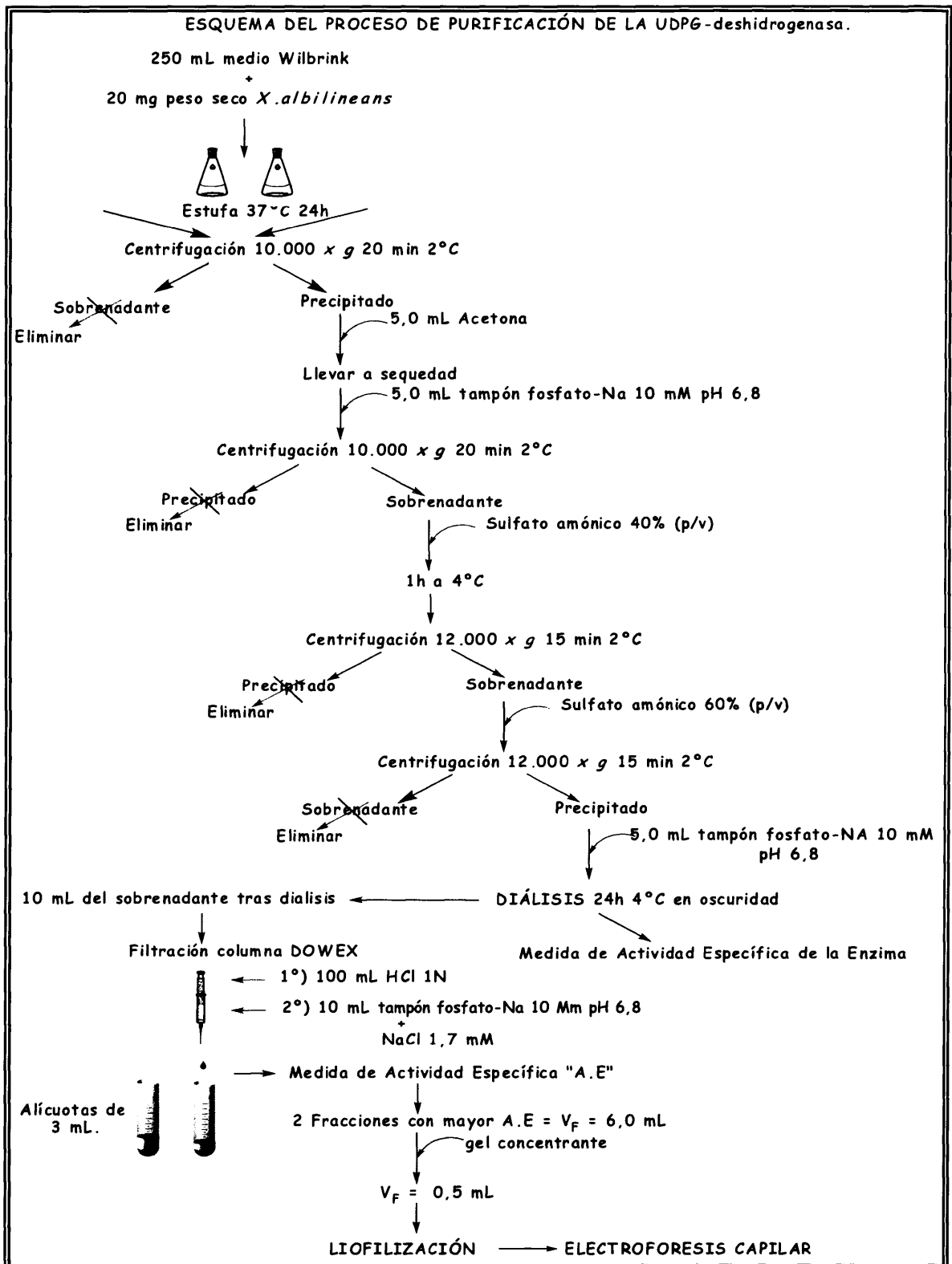


Figura 29: Esquema detallado del protocolo utilizado para llevar a cabo la purificación de la enzima UDPG-deshidrogenasa.

3.5.2. Determinación del pI y la masa molecular la enzima UDPG-deshidrogenasa.

El pI de la UDPG-dh se estimó por Electroforesis Capilar, interpolando el valor de tiempo de migración en una recta patrón construida con proteínas con pI conocido (Tabla VI). Se usó benceno como marcador neutro.

Patrón (pI)	Tiempo de migración (t_m)(min)
Invertasa 4,0	15,89
Ferritina de caballo 4,4	16,71
Albumina bovina (BSA) 4,9	18,01
Alcohol DH (levadura) 5,4	18,42
Anhidrasa Carbónica 5,8	22,35
Mioglobina 7,0	25,37
Citocromo c 10,6	28,57
Invertasa de <i>Evernia prunastri</i> 13,0	41,13

Tabla VI: pI y tiempo de migración expresado en minutos de las proteínas estándar utilizadas.

El peso molecular de la UDPG-deshidrogenasa se estimó de manera similar a lo descrito para la pI, interpolando el valor de tiempo de migración de la UDPG - dh en una recta patrón construida con proteínas con peso molecular conocido (Tabla VII).

Patrones	Tamaño molecular.	Tiempo de migración t_m (min)
Ferrredoxina de espinaca	6,0 kDa	38,20
Citocromo c	12,5kDa	28,57
Mioglobina	17,8kDa	25,37
Anhidrasa carbónica	29,0kDa	22,35
Alcohol DH (levadura)	150 kDa	18,42
Catalasa H.B.	240 kDa	14,33

Tabla VII: Proteínas estándar utilizadas con tamaño molecular y tiempo de migración, expresado en minutos, conocido para la determinación del tamaño molecular de la UDPG-deshidrogenasa.

3.5.3. Separación del ácido UDP-glucurónico de la UDP-Glucosa mediante Electroforesis Capilar.

3.5.3.1 Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo).

La separación de UDP-GlcA y UDPG se llevó a cabo en un equipo P/ACE™ MDQ Glycoprotein system (Beckman Coulter, U.S.A). El sistema contaba con un detector diode-array incorporado, con un ancho de banda de 6 nm. Los electroferogramas se obtuvieron mediante el uso de un ordenador acoplado al sistema, utilizando el programa 32 Karat (v. 7.0). Se utilizaron capilares de sílice recubiertos de poliimida (Beckman Coulter, U.S.A.) de 61 cm de longitud total, 50 cm de longitud efectiva, 75 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo. El tampón utilizado como electrolito estaba compuesto de ácido β -resorcílico 5 mM y TTAOH (hidróxido de tetradeciltrimetilamonio) 1 mM a un pH 3,0 resuspendidos en metanol al 0,5 % (v/v). Tanto UDP-GlcA como UDPG fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. Las mezclas de reacción y el control (sin UDPG) se secaron en flujo de aire continuo y los residuos secos obtenidos fueron resuspendidos en 200 μL del tampón (ácido β -resorcílico 5 mM + TTAOH 1 mM disueltos en metanol 0,5 %) para posteriormente ser analizados. Se utilizaron disoluciones estándar 0,5 mg mL^{-1} y 1,0 mg mL^{-1} de diferentes patrones, las cuales fueron inyectadas en el capilar a una presión de 0,5 psi durante 5 s, lo que supuso un volumen de inyección de aproximadamente 40 nL. Durante la separación, la temperatura del capilar se mantuvo constante a 25°C y las muestras permanecieron a 10°C hasta ser inyectadas. Todas las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 20kV de tal forma que la migración de los compuestos iónicos se producía desde el cátodo hacia el ánodo (Electroforesis Capilar con reversión de polaridad). La detección se efectuó midiendo el descenso de absorbancia a 200 nm y a 214 nm.

3.5.3.2 Cromatografía Micelar Electrocinética

Al igual que en el apartado anterior, se procedió a identificar el producto de reacción de la UDPG-dh utilizándose el mismo equipo de Electroforesis Capilar pero aplicándose la técnica de Cromatografía Micelar Electrocinética. En esta técnica, al tampón de migración utilizado (el ácido β -resorcílico 5 mM + TTAOH 1 mM disueltos en metanol 0,5 %) se le adicionó un agente surfactante, SDS (dodecil sulfato sódico), a una concentración 15 mM.

Las muestras preparadas a las mismas concentraciones que en el apartado anterior, se resuspendieron en el mismo tampón formado por la mezcla de (ácido β -resorcílico 5 mM + TTAOH 1 mM disueltos en metanol 0,5 %) sin SDS. Durante la separación, la temperatura del capilar se mantuvo constante a 25°C y las muestras permanecieron a 10°C hasta ser inyectadas. Todas las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 20 kV de tal forma que la migración de los compuestos iónicos se producía desde el cátodo hacia el ánodo (Cromatografía Micelar Electrocinética con reversión de polaridad).

3.5.3.3 Electroforesis Capilar con polaridad ánodo-cátodo

Para detectar el producto de reacción de la UDPG-dh mediante la técnica de Electroforesis Capilar con polaridad ánodo-cátodo, se utilizó el mismo equipo de Electroforesis Capilar citado en los apartados anteriores 3.5.3.1. y 3.5.3.2. Se utilizaron capilares de sílice recubiertos de poliimida (Beckman Coulter, U.S.A.) de 61 cm de longitud total, 50 cm de longitud efectiva, 75 μ m de diámetro interno y 375 μ m de diámetro externo. El tampón de migración utilizado, el acondicionamiento del capilar y la regeneración del mismo se llevaron a cabo de la misma manera que en el apartado anterior. Tanto UDP-GlcA como la UDPG fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. Las mezclas de reacción y el control (sin UDPG) se secaron en flujo de aire continuo y los residuos secos obtenidos fueron resuspendidos en tampón borato sódico 10 mM, pH 9,2 para ser analizados.

Se utilizaron disoluciones estándar a dos concentraciones (0,5 mg mL⁻¹) y (1,0 mg mL⁻¹) de diferentes patrones, las cuales fueron inyectadas en el capilar a una presión de 0,5 psi durante 5 s, lo que supuso un volumen de inyección de aproximadamente 40 nL. Durante la separación, la temperatura del capilar se mantuvo constante a 25°C y las muestras permanecieron a 10°C hasta ser inyectadas. Todas las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 20 kV de tal forma que la migración de los compuestos iónicos se producía desde el ánodo hacia el cátodo (Electroforesis Capilar con polaridad ánodo-cátodo) y como electrolito se utilizó tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2. La detección se efectuó midiendo la absorbancia a 200 nm y a 214 nm.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LA UDPG-deshidrogenasa.

3.6.1. Cinética de saturación por sustrato.

Después de determinar qué fracción recogida tras pasar por la columna Dowex desarrollaba la mayor actividad específica, se realizó el ensayo de dependencia de velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato, UDPG. Se prepararon mezclas de reacción en las que variaba la concentración de UDPG, entre 0,16 y 3,3 mM. Cada mezcla de reacción contenía un volumen creciente de UDPG 10 mM disuelto en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, desde 0,05 a 0,50 mL; 0,1 mL de NADPH a una concentración $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$; 0,5 mL del eluato obtenido de la columna de Dowex y, por último, tampón fosfato sódico 10 mM, a pH 6,8 de volumen variable en función de la concentración de UDPG utilizada en cada ensayo entre 2,35 y 0,3 mL. El control que se utilizó contenía 0,5 mL de la enzima, 0,1 mL de NADPH a una concentración de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ y 2,4 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8. Posteriormente se procedió a valorar la actividad enzimática en cada caso.

3.6.2. Cinética de reacción frente a diferentes concentraciones de NADPH.

Se prepararon mezclas de reacción en las que variaba la concentración de NADPH entre 0,02 mM y 0,43 mM. A cada mezcla de reacción se añadieron 0,5 mL de UDPG 10 mM disuelta en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, 0,5 mL de la enzima purificada y suficiente tampón hasta obtener un volumen final de mezcla de reacción de 3,0 mL. El control contenía 0,5 mL de la enzima, NADPH a concentraciones variables y tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, hasta alcanzar un volumen total de mezcla de reacción de 3,0 mL. En cada uno de estos ensayos se midió la absorbancia a 340 nm a tiempo=0 sin aplicar O_2 y nuevamente tras 30 min en baño con agitación a 37°C y con suministro de O_2 . Posteriormente se calcularon las correspondientes velocidades de reacción para cada ensayo.

3.6.3. Temperatura y pH óptimo de la enzima.

Para la determinación de la temperatura óptima de la UDPG-dh, se llevaron a cabo ensayos en los que cada mezcla de reacción contenía 0,5 mL de la enzima purificada, 0,5 mL de NADPH $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, 0,5 mL de UDPG 10 mM disuelta en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, y 1,5 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8.

El control contenía 0,5 mL de la enzima, 0,5 mL de NADPH ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) y 2 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8. En cada uno de estos ensayos se midió la absorbancia de las mezclas a 340 nm a tiempo=0 sin aplicar O_2 y transcurridos 30 min, con suministro de O_2 , a diferentes temperaturas según cada ensayo. Las temperaturas utilizadas en cada ensayo fueron: 4°C , 22°C , 37°C Y 70°C . Posteriormente se calcularon las correspondientes velocidades de reacción para cada uno de estos ensayos.

Para la determinación del pH óptimo se prepararon mezclas de reacción, en las que cada una contenía 0,5 mL de la enzima, 0,5 mL de NADPH ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$), 0,5 mL de UDPG 10 mM, disuelta en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, y 1,5 mL de tampón, el cual variaba en cada ensayo.

Los tampones utilizados fueron los siguientes.

- ✓ Tampón Acetato sódico 20 mM **pH=3**
- ✓ Tampón Acetato sódico 20 mM **pH=5**
- ✓ Tampón Fosfato sódico 20 mM **pH=6,14**
- ✓ Tampón Fosfato sódico 20 mM **pH=6,8**
- ✓ Tampón Borato sódico 20 mM **pH=8,2**
- ✓ Tampón Borato sódico 20 mM **pH=9,2**

Los controles en ausencia de UDPG se prepararon de idéntica forma a la descrita para determinar la temperatura óptima. En cada uno de los ensayos se midió la absorbancia a 340 nm a tiempo=0 sin aplicar O_2 y transcurridos 30 min, con suministro de O_2 . Posteriormente se calcularon las correspondientes velocidades de reacción para cada uno de estos ensayos.

3.6.4. Secuenciación del extremo N-terminal de UDPG-deshidrogenasa.

La fracción purificada a homogeneidad que proporcionaba un pico en Electroforesis Capilar fue procesada para la secuenciación del extremo N-terminal usando un Secuenciador Applied Biosystems Procise™.

La proteína fue marcada en sus grupos α -amino con cloruro de dansilo, sometida a digestión progresiva por aminopeptidasas y separados los aminoácidos liberados en sucesivas digestiones por HPLC de fase reversa en tandem. La detección de los aminoácidos se llevó a cabo en un detector fluorimétrico, que detecta emisión de fluorescencia a 460 nm tras excitación con una luz de 360nm. La secuencia es deducida de acuerdo con la máxima concentración de un aminoácido particular en los sucesivos digeridos.

3.7. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE JUGOS DE CAÑA DE AZÚCAR.

Transcurridos 22 meses después de la siembra, se cortaron tallos de plantas procedentes del cultivar Barbados 42-231. Posteriormente los tallos fueron molidos mecánicamente y, el jugo extraído, procesado para su posterior análisis. El jugo así obtenido se ha denominado jugo crudo. Este jugo fue clarificado mediante adición de carbonato sódico a saturación para poder así precipitar las macromoléculas solubles, las cuales fueron separadas mediante centrifugación a $10.000 \times g$ durante 20 min, a 4°C, empleándose una centrífuga Beckman modelo J2-21, con un rotor modelo JA21. El precipitado obtenido fue descartado y el sobrenadante fue filtrado a través de papel Whatman nº1. De esta forma se eliminaron ceras e impurezas carentes de interés para el análisis posterior de las muestras. El filtrado obtenido fue dializado frente a agua destilada durante 12 h a una temperatura de 4°C. El dializado fue conservado a -26°C para la posterior separación de glicoproteínas de alto y mediano peso molecular.

3.8. SEPARACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS DE ALTO Y MEDIANO PESO MOLECULAR MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

Un volumen de 10 mL del jugo de caña de azúcar clarificado según se explicó en el apartado anterior, fue filtrado a través de una columna rellena de Sephadex-G 10 de 15 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro interno, embebida en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8. La elución fue llevada a cabo con el mismo tampón. El rango de exclusión fue determinado a partir del patrón de elución de una mezcla conteniendo azul dextrano 2.000 0,029 M (polímero de unidades de D-glucosa de alto peso molecular: $P_m = 2.000.000$) y cloruro de cobalto (CoCl_2) 0,12 M ($P_m = 273,95$), empleando como tampón de elución el mismo tampón fosfato utilizado para

equilibrar las columnas. Los primeros 22 mL de eluato, correspondientes al volumen muerto, fueron descartados. Los siguientes 14 mL (del mL 23 al 37), conteniendo una mezcla de glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG = *High-Molecular Mass Glycoproteins*) y de mediano peso molecular (MMMGS = *Mid-Molecular Mass Glycoproteins*), fueron recogidos (de Armas *et al.*, 1999). A partir de los 37 mL, el eluato fue descartado. Fue necesario llevar a cabo dos filtraciones a través de esta columna G-10, para obtener 28 mL de mezcla de glicoproteínas.

Una alícuota (25 mL) de la mezcla de glicoproteínas recogida en el paso anterior, fue filtrada de nuevo a través de una columna rellena de Sephadex-G 50 de 30 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro interno embebida en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, y calibrada de la manera descrita anteriormente. Los primeros 49 mL de eluato, correspondientes al volumen muerto, fueron descartados. Los siguientes 76 mL (del mL 50 al 127), fueron recogidos en dos fracciones. La primera de ellas, con un volumen de 26 mL (del mL 50 al 76) fue considerada como la fracción que contenía glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG). La siguiente, con un volumen de 50 mL (del mL 77 al 127), fue considerada como la fracción que contenía glicoproteínas de mediano peso molecular (MMMGS) (Martínez *et al.*, 2000). En las fracciones eluidas se valoró el contenido en azúcares empleando el método de Dubois *et al.*, (1956) según se explica en el apartado 3.8.1.

3.8.1. Valoración de azúcares.

La valoración de azúcares de las fracciones obtenidas mediante filtración por columna se realizó siguiendo el método de Dubois *et al.*, (1956), en el que los azúcares son hidrolizados con ácido sulfúrico en presencia de fenol. Para ello, se tomaron 0,5 mL de la muestra y se añadieron 0,5 mL de una disolución acuosa de fenol al 5%. Tras agitar suavemente, se incorporaron 2,5 mL de ácido sulfúrico. Una vez fría la mezcla de reacción, se midió la densidad óptica a 490 nm. El valor obtenido en unidades de absorbancia se transformó en mg. mL⁻¹ de azúcar interpolando el valor de absorbancia en una recta de calibrado construida con concentraciones conocidas de glucosa (desde 20 a 105 µg. mL⁻¹). La densidad óptica de las diferentes muestras se midió en un espectrofotómetro Zeiss modelo PM 2 DL.

3.9. PRODUCCIÓN DE UDPG-deshidrogenasa EN PRESENCIA DE INHIBIDORES.

Inóculos de 20 mg de peso seco de la bacteria *X. albilineans* fueron cultivados en medio Wilbrink líquido conteniendo HMMG o MMMG, obtenidas de tallos de caña de azúcar de 22 meses de edad de la variedad Barbados 42-231, altamente susceptible a la enfermedad de la escaldadura foliar, durante un periodo de 24 h a una temperatura de 37°C. Cuando se indique, se adicionó al medio de cultivo 8-azaguanina 0,1 mM (inhibidor del proceso de transcripción), cloranfenicol 0,1 mM (inhibidor del proceso de la traducción) o piperina 0,03 mM (inhibidor específico de UDPG-dh NAD⁺ dependiente) **Fig 30**.

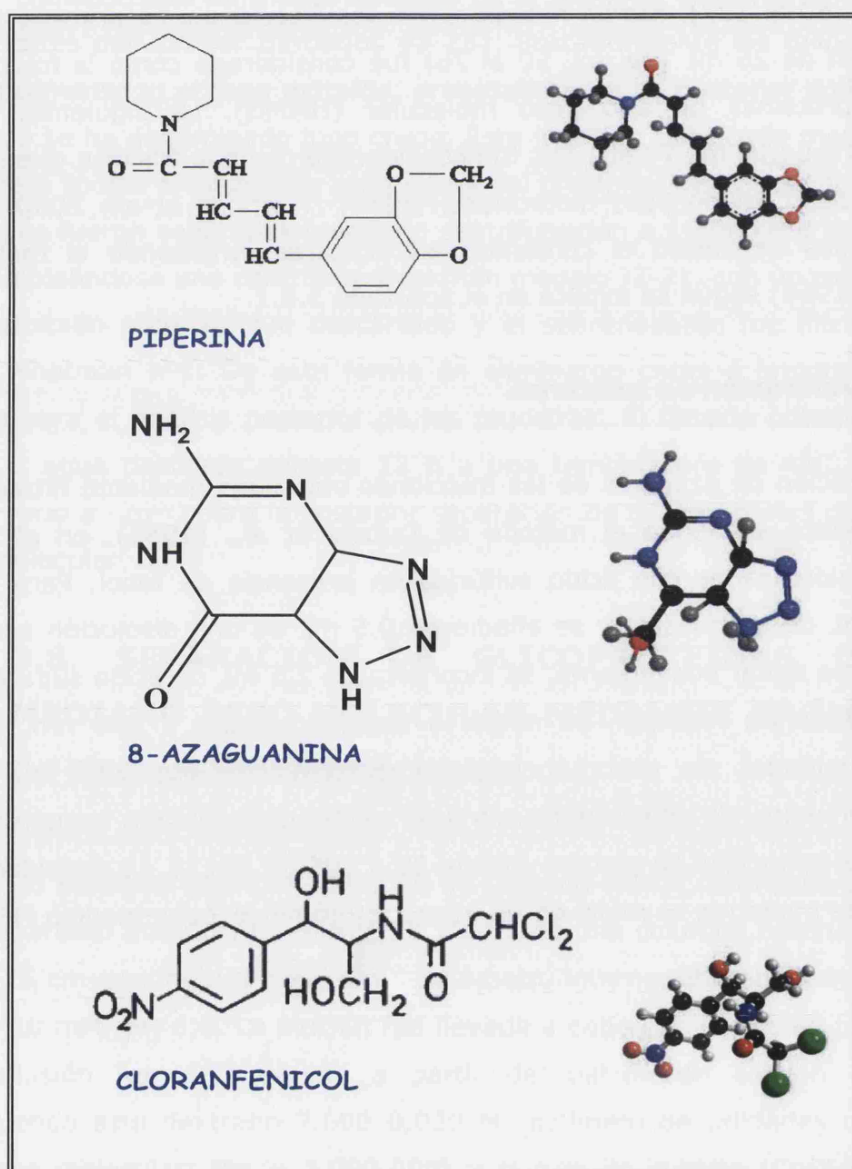


Figura 30: Estructura química de los inhibidores piperina, 8-azaguanina y cloranfenicol.

A diferentes tiempos, la bacteria fue recuperada por centrifugación a 10.000 x g durante 20 min a 2°C. Los precipitados fueron lavados con agua destilada y resuspendidos en 1,0 mL de acetona pura, secándose en corriente de aire continuo y el residuo sólido obtenido tras el secado fue resuspendido en 5,0 mL de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,8, conteniendo a su vez un cocktail inhibidor de proteasas (Sigma Chemical Co.). Posteriormente se volvió a centrifugar a 10.000 x g durante 20 min a 2°C. Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación se utilizaron para la valoración de proteínas, según Warburg & Christian (1941) y para el ensayo de medida de actividad enzimática de la UDPG-dh según se ha explicado en el apartado 3.3.

3.10. VALORACIÓN DEL XANTANO PRODUCIDO POR *Xanthomonas albilineans* TRAS LA INFECCIÓN DE TALLOS PROCEDENTES DE CAÑA DE AZÚCAR.

3.10.1. Preparación de las muestras y aislamiento del xantano.

Segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 de 12 meses de edad y de 9,0 cm de longitud, fueron inoculados con 100 µL de una suspensión celular de *X. albilineans* cultivada en medio Wilbrink (equivalente a 0,008 mg de peso seco de la bacteria). La inoculación fue llevada a cabo depositando 100 µL de la suspensión celular en las zonas de corte de cada segmento y posteriormente fueron mantenidos a temperatura ambiente. Cada 24 h, hasta un total de 9 días, dos segmentos (uno control y otro inoculado), fueron molidos mecánicamente por separado y el jugo obtenido (25 mL aproximadamente de cada segmento), fue centrifugado a 10.000 x g durante 15 min a una temperatura de 2°C.

Los precipitados obtenidos fueron eliminados y los sobrenadantes se almacenaron a -26°C para ser posteriormente procesados. En el caso de los tallos control sobre las zonas de corte se depositaron 100 µL de agua destilada estéril. Alícuotas de 5,0 mL de los sobrenadantes fueron filtradas a través de una columna de Sephadex G-10 conectada en serie con una columna de Sephadex G-50.

Ambas columnas presentan las mismas características que las mencionadas en el apartado 3.8, con la única salvedad que están conectadas entre sí.

Los primeros 70 mL de eluato, correspondientes al volumen muerto, fueron descartados. Los siguientes 30 mL recogidos (del mL 71 al 101), contenían una mezcla de glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG) y los 80 mL restantes (del mL 102 al 182), contenían una mezcla de glicoproteínas de mediano peso molecular (MMM) (Martínez *et al.*, 1990 a). Tanto en las fracciones correspondientes a las HMMG así como en las fracciones MMM se valoró la cantidad de azúcares siguiendo el método de Dubois *et al.*, (1956), según se ha explicado en el apartado 3.8.1. Las fracciones obtenidas a partir de los 182 mL de elución, se consideraron carbohidratos de bajo peso molecular denominados LMMC (*Low Molecular Mass Carbohydrates*) y fueron descartadas (**Fig.31**).

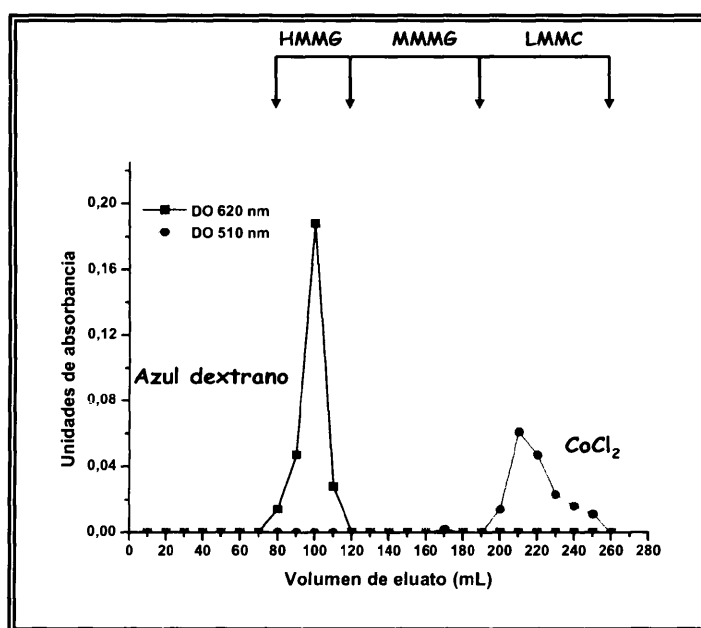


Figura 31: Perfil de elución de una mezcla de azul dextrano y CoCl_2 filtrada a través de dos columnas consecutivas de Sephadex G-10 y G-50. El azul dextrano y el cloruro de cobalto se monitorizaron por medida de la densidad óptica de las diferentes fracciones en sus máximos de absorción, 620 nm y 510 nm respectivamente.

Del volumen restante de los sobrenadantes se tomaron alícuotas de 10 mL, a las que se le adicionaron 14,4 mL de alcohol isopropílico conteniendo KCl al 3% (p/v) en constante agitación a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se incubó a 4°C durante 2 h y después se centrifugó a 14.000 x g durante 20 min a 2°C (Solás *et al.*, 2003). El sobrenadante obtenido fue descartado, mientras que el precipitado, conteniendo el xantano, fue resuspendido en 10 mL de tampón fosfato sódico 10 mM a pH 6,8.

3.10.2. Fraccionamiento.

Alícuotas (5,0 mL) de los extractos conteniendo xantano fueron filtradas a través de una columna de Sephadex G-10 conectada a otra columna de Sephadex G-50. Ambas columnas, como se ha mencionado en el apartado 3.10.1., presentan las mismas características que las mencionadas en el apartado 3.8. con la única salvedad que están conectadas entre sí. El tampón de elución utilizado fue el mismo que se utilizó en el apartado 3.8. Los primeros 58 mL de eluato obtenidos, correspondientes a una parte del volumen muerto, fueron descartados, mientras que los siguientes 12 mL (del mL 58 al 70), recogidos en alícuotas de 3,0 mL, contenían polisacáridos de peso molecular superior a las HMMG. Las HMMG eluyeron desde los mL 71 al 101. Las MMMG eluyeron desde los 102 mL a los 182 mL. El contenido en azúcares totales fue valorado en dichas fracciones según se describe en los apartados 3.8.1 y también se llevó a cabo la medida de proteínas de acuerdo con Warburg & Christian (1941) (**Fig. 32**).

3.10.3. Hidrólisis ácida y extracción de azúcares.

Aquellas fracciones obtenidas por filtración a través de Sephadex-G50 que dieron reacción positiva para azúcares (del mL 58 al mL 70) de jugos obtenidos de segmentos de tallo de caña de azúcar transcurridos 5 días tras el proceso de inoculación con la bacteria, fueron sometidas a hidrólisis ácida. Para ello, 5,0 mL de dichas muestras fueron mezclados con 5,0 mL de HCl 6N. La mezcla se mantuvo a 80 °C durante 16 h y luego se llevó a sequedad bajo corriente de aire a temperatura ambiente. El residuo seco fue resuspendido en 3,0 mL de etanol frío al 80% (v/v) y almacenado a 4°C durante 2 h. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 19.000 x g durante 15 min a 2°C. El sobrenadante obtenido, conteniendo los azúcares solubilizados en etanol, se llevó a sequedad bajo corriente de aire a temperatura ambiente.

Finalmente, los residuos secos procedentes de la extracción de xantano, fueron resuspendidos en 500 µL de tampón borato sódico 10 mM, pH 9,2, y utilizados para detectar azúcares mediante Electroforesis Capilar. Los tallos control (no inoculados) se sometieron al mismo protocolo que el descrito anteriormente. Fracciones de HMMG y de los xantanos, obtenidas por filtración a través de Sephadex-G50, correspondientes a diferentes días tras inoculación con la bacteria, fueron liofilizadas y posteriormente resuspendidas en 500 µL de tampón borato sódico 10 mM a pH 9,2 para ser utilizadas en el análisis mediante Electroforesis Capilar.

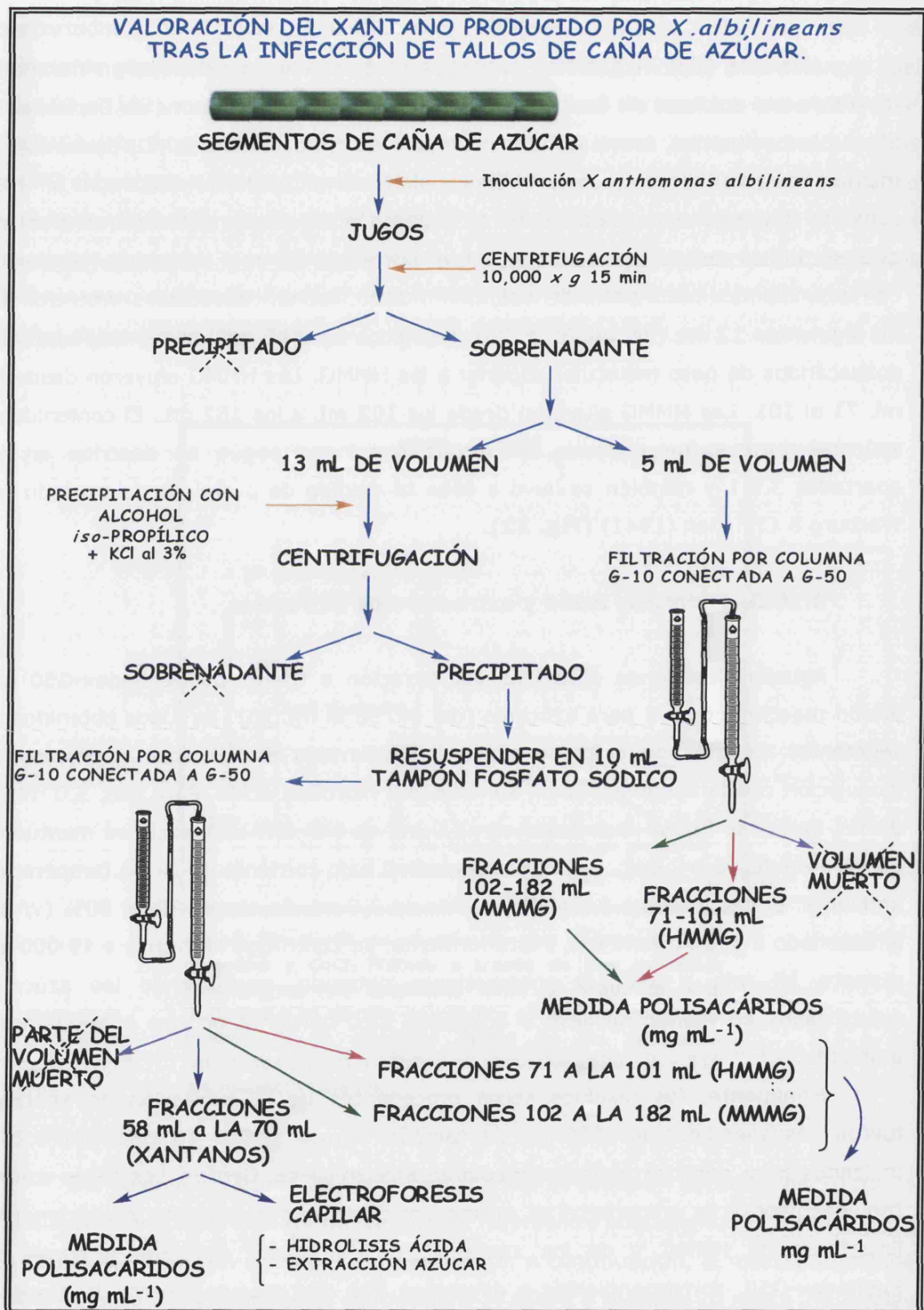


Figura 32: Esquema del proceso de la valoración del xantano producido por *Xanthomonas albilineans* tras la infección de tallos de caña de azúcar.

3.10.4. Valoración del xantano por Electroforesis Capilar.

El aparato utilizado para llevar a cabo este análisis fue el mismo que el utilizado en el apartado 3.5.3., por lo que su acondicionamiento se llevó a cabo de idéntica manera. Las muestras analizadas, así como los correspondientes patrones, se prepararon a una concentración $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 11 Kv aplicado de tal forma que la migración de los compuestos iónicos se producía desde el ánodo hasta el cátodo. Como electrolito se utilizó tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2. Los electroferogramas se obtuvieron mediante un ordenador acoplado al sistema, utilizando el programa 32 Karat (v. 7.0).

3.10.5. Ensayo de actividad proteasa

Cultivos de *X. albilineans* en medio Wilbrink líquido a 37°C durante 24 h, se centrifugaron a $10,000 \times g$ durante 20 min a una temperatura de 2°C . Los precipitados obtenidos fueron lavados con agua destilada y resuspendidos en 1,0 mL de acetona pura. Posteriormente fueron secados en corriente de aire a temperatura ambiente y el residuo sólido obtenido fue resuspendido en 5,0 mL de tampón Tris-HCl, pH 8,0. Posteriormente se llevó a cabo una nueva centrifugación a $10,000 \times g$ durante 20 min a una temperatura de 2°C . Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados para medir proteínas mediante Warburg & Christian (1941) y para medir actividad proteasa. La medida de actividad proteasa se llevó a cabo utilizando caseína como sustrato. Se prepararon mezclas de reacción conteniendo 0,5 mL de una disolución proteica bacteriana a una concentración de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; 1,0 mL de caseína al 6% (p/v) y 1,0 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. La reacción se desarrolló a una temperatura constante de 37°C durante 30 min. Como control, se prepararon mezclas de reacción en ausencia de sustrato. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró mediante la inmersión de los tubos en un baño con agua a 100°C durante 3 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 0,5 mL de reactivo de Folin. El color producido en la reacción es debido a la presencia de tirosina libre y fue medido a 540 nm (Shastri y Prasad, 2002). En determinados tubos de reacción, se preincubaron las proteínas bacterianas durante 5 min a una temperatura de 37°C con 0,5 mL de disoluciones de HMMG ó MMMG preparadas a una concentración de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ procedentes de jugos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 de 12 meses de edad inoculados y sin inocular con *X. albilineans*. Tras 5 min de contacto, se adicionó el sustrato de la reacción, caseína. Se preparó un último tubo en el cual las glicoproteínas HMMG ó MMMG eran sustituidas por un cocktail inhibidor

de proteasas llevándose a cabo la preincubación y la reacción en las mismas condiciones anteriormente descritas (**Tabla VIII**).

TUBOS	Tampón (mL)	Proteína bacteriana (Proteasa) (mL)	HMMG (mL)	MMMG (mL)	Cocktail (mL)	Caseína (mg/mL)	Reactivo de Folin
1	1					1	0.5
2	1	0.5				1	0.5
3	0.5	0.5	0.5 (no inoc)			1	0.5
4	0.5	0.5		0.5 (no inoc)		1	0.5
5	0.5	0.5			0.5	1	0.5
6	0.5	0.5	0.5 (inoc)			1	0.5
7	0.5	0.5		0.5 (inoc)		1	0.5

Tabla VIII: Componentes de los diferentes tubos de reacción para llevar a cabo el experimento de medida de la actividad proteasa. El orden de adición de los componentes es el que figura en la tabla de izquierda a derecha.

3.11. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE LA SACAROSA ORIGINADAS POR EL XANTANO PRODUCIDO POR *Xanthomonas albilineans*.

3.11.1. Material vegetal utilizado.

Tallos de caña de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231, de 9 meses de edad, fueron inoculados en el invernadero del Real Jardín Botánico Alfonso XIII (Universidad Complutense de Madrid), inyectándose 5,0 mL de una suspensión celular de *X. albilineans*, cepa NCPPB 887, cultivada en medio Wilbrink líquido.

3.11.2. Metodología de la inoculación.

Un matraz con 50 mL de medio Wilbrink líquido (Dye, 1980) fue inoculado con 20 mg de peso seco de la bacteria *X. albilineans*. El matraz se mantuvo en estufa a 37°C durante 48 h. Pasado este tiempo se procedió a inocular los tallos aplicando aproximadamente 5,0 mL del cultivo bacteriano (equivalente a un 1g de peso seco

de la bacteria) en cada punto de inoculación. La inoculación se hizo en los entrenudos 1 y 2 de cada tallo, los más viejos de la planta.

En cada entrenudo se eligieron dos puntos de inoculación. El mismo protocolo fue utilizado para el control utilizando para la inoculación 5,0 mL de agua destilada en lugar de la suspensión celular bacteriana (**Fig.33**).



Figura 33: Proceso de inoculación con *Xanthomonas albilineans* en tallo de caña de azúcar de 9 meses de edad de la variedad Barbados 42-231.

3.11.3. Tratamiento de las muestras en el laboratorio.

Pasados 7 días de la inoculación, se procedió a cortar los tallos a ras del suelo para ser manipulados en el laboratorio. Los entrenudos 1 y 2 se guardaron y el resto de la caña fue eliminada. Cada entrenudo fue exprimido en una prensa y parte del jugo obtenido de cada uno fue guardado por separado para un posterior tratamiento de clarificación. El resto del jugo se utilizó para la medida del brix refractométrico, usando un refractómetro de Carl Zeiss (Jena) y expresando los resultados como porcentaje de sólidos solubles. Los valores obtenidos fueron comparados con los valores de sólidos solubles de disoluciones de concentraciones conocidas de sacarosa.

3.11.4. Clarificación del jugo

Volúmenes de 10 mL de los jugos obtenidos en el proceso anteriormente descrito fueron tratados con una disolución saturada de bicarbonato de amonio hasta obtener un pH final de 8,0. Pasados 10 min, las muestras se centrifugaron a 10,000

× g durante 20 min. El precipitado obtenido, conocido con el nombre de "cachaza" y rico en lípidos principalmente, se desechó.

El sobrenadante se evaporó en un baño a 80°C hasta obtener un volumen final de 2,0 mL. Finalmente, muestras con 100 µL de los jugos clarificados, se depositaron en diferentes portas para observar el proceso de cristalización de la sacarosa. Para ello se utilizó un microscopio Zeiss invertido acoplado a una cámara digital Nikon Coolpix 5000.

3.11.5. Purificación del xantano

La preparación de las muestras, aislamiento del xantano y su fraccionamiento, se efectuó de la misma manera que lo reflejado en los apartados **3.10.1** y **3.10.2**, respectivamente. En este caso, las fracciones de eluato entre el mL 58 y el mL 70 se juntaron, obteniéndose un volumen final de 12 mL. El mismo protocolo se utilizó para las muestras control de plantas no inoculadas. Para comprobar el grado de cristalización de la sacarosa se prepararon dos series de portas conteniendo 50 µL de una disolución de sacarosa concentrada o bien una mezcla de esta disolución a la que se le adicionaron otros 50 µL de una disolución de xantanos procedente de plantas inoculadas. Se tomaron imágenes temporizadas del proceso de cristalización a las 4, 6 y 24 h, mediante la utilización de un microscopio Zeiss invertido acoplado a una cámara digital Nikon Coolpix 5000.

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICACIÓN Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa, NADPH-DEPENDIENTE PROCEDENTE DE LA BACTERIA *Xanthomonas albilineans*.

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de los ensayos realizados para determinar las condiciones de máxima producción de la enzima UDPG-dh, su purificación, determinación de su pI, caracterización de UDP-GlcA como producto de reacción y su separación de UDPG mediante Electroforesis Capilar.

También se procedió a caracterizar la enzima, calculando algunas de sus constantes cinéticas, así como su pH y temperatura óptimos. Igualmente se llevó a cabo la secuenciación del extremo N-terminal de dicha enzima purificada a homogeneidad.

4.1.1. Cinética de producción de la UDPG-deshidrogenasa.

Utilizando extractos libres de células de *X. albilineans* cultivada sobre medio Wilbrink como fuente de enzima, no fue observada ninguna reacción redox cuando dichos extractos acelulares fueron suplementados con UDPG como substrato y NAD^+ o NADP^+ como cofactores de oxido-reducción.

No obstante, una pequeña oxidación de NADPH fue observada en mezclas de reacción que contenían proteína bacteriana y UDPG. La enzima fue sin embargo inactiva frente a NADH. La cinética de producción de esta hipotética UDPG-dh dependiente de NADPH por *X. albilineans* en cultivo líquido fue medida sin y con aireación de las correspondientes mezclas de reacción. El suplemento de oxígeno incrementaba grandemente la actividad (**Fig. 34 A**).

Seleccionando la condición de aireación de las mezclas, se llevaron a cabo modificaciones en la fuente de carbono del medio Wilbrink original midiendo la producción de la enzima en el primer día de cultivo, siendo éste día el de máxima producción para la UDPG-dh (**Fig. 34 B**). La máxima recuperación de la enzima se logra sobre sacarosa 58 mM mientras que la adición de glucosa o la substitución total del disacárido por glucosa prácticamente anulan la actividad enzimática.

Para verificar si el efecto de la glucosa se ejercía a través de una represión catabólica de la enzima, se añadió AMPc 0,5 mM a los medios de cultivo que contenían glucosa y la actividad enzimática fue medida durante el primer día de cultivo.

Resultados

Este planteamiento contemplaba la posibilidad de que la glucosa inhibiera el gen que codifica para la UDPG-dh. El AMPc actuaría entonces eliminando el catabolito del lugar de su unión al DNA, permitiendo así la transcripción del gen.

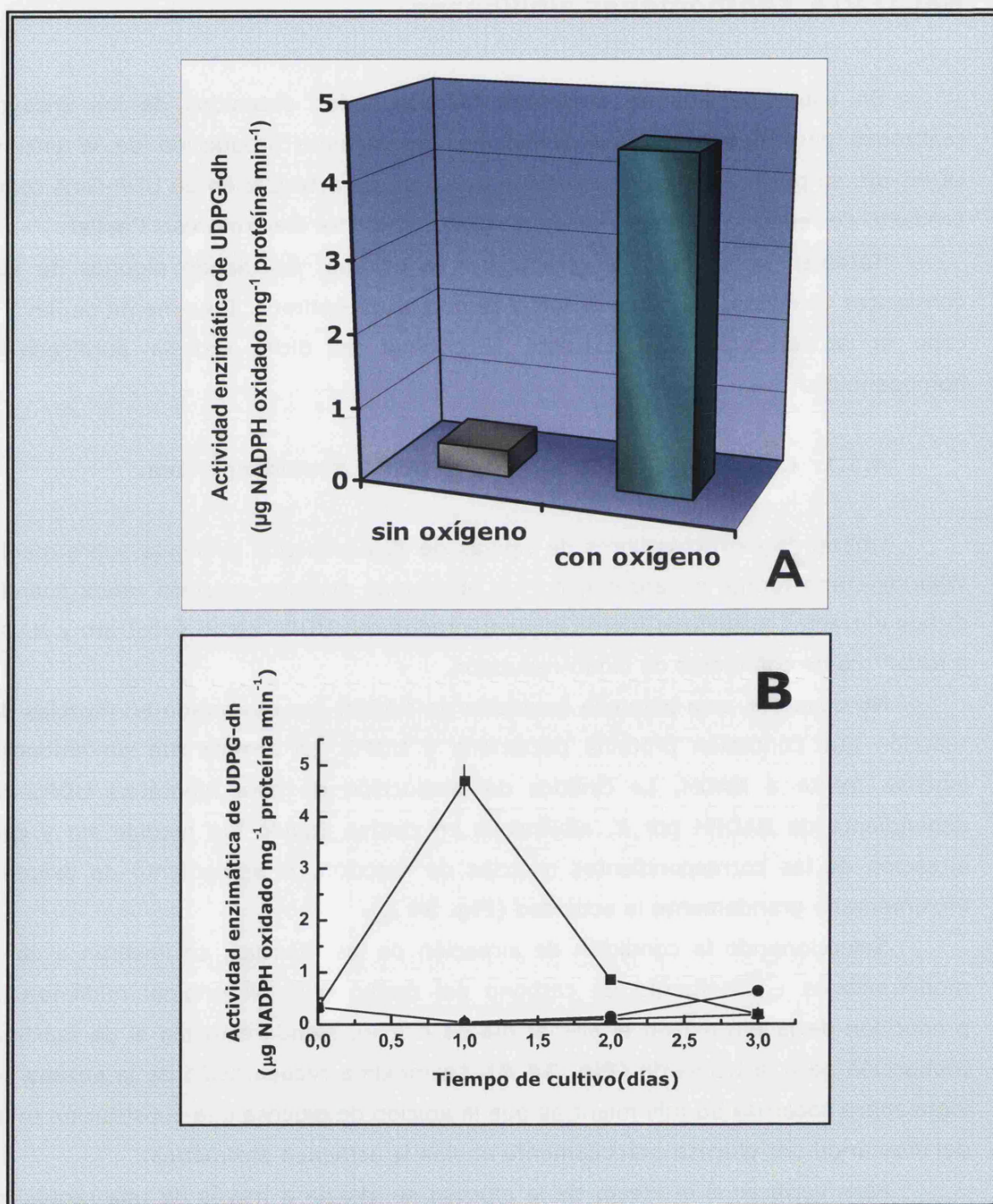


Figura 34: (A) Influencia de la aireación en la oxidación de NADPH por UDPG-deshidrogenasa a partir de un extracto libre de células de *Xanthomonas albilineans* cultivadas durante 24 h en medio Wilbrink. Los valores son la media de tres réplicas. (B) Producción de UDPG-deshidrogenasa por *Xanthomonas albilineans* transcurridas 24 h suplementando el medio de cultivo Wilbrink con sacarosa 58 mM (■), glucosa 58 mM (●) ó una mezcla equimolar de ambos azúcares (▲). Los valores son la media de tres réplicas.

Como se muestra en la **Fig. 35**, el nucleótido cíclico no aumentó la velocidad de oxidación del NADPH, por lo que se debe descartar la hipótesis de un efecto glucosa sobre la UDPG dh.

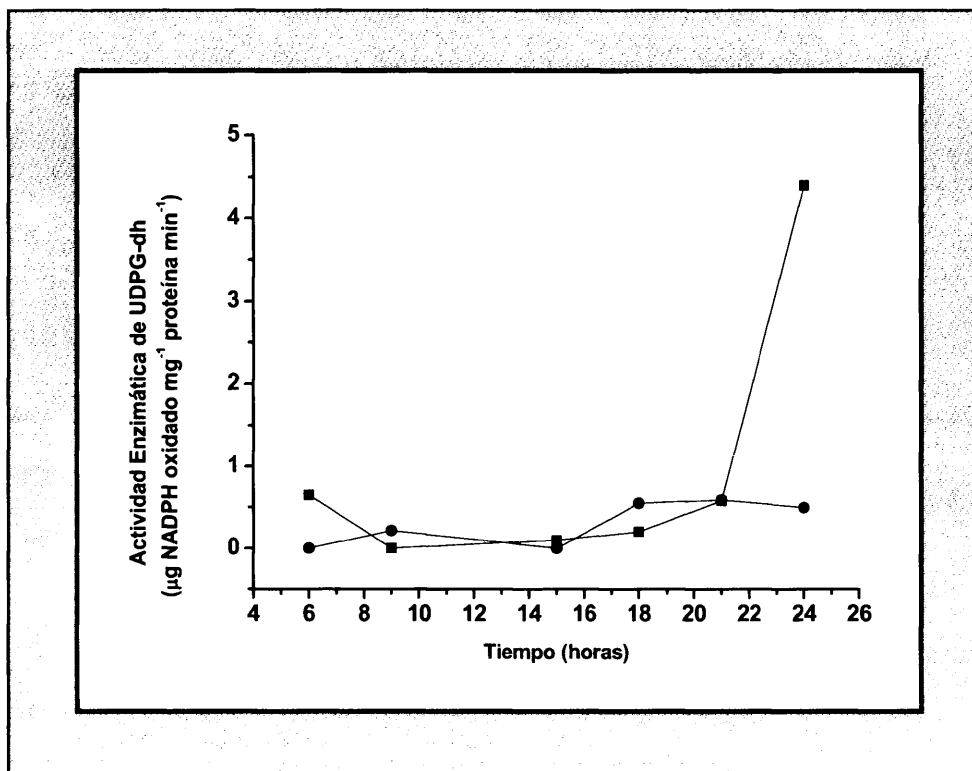


Figura 35: Efecto del AMP cíclico (0,5 mM) sobre la producción de UDPG-deshidrogenasa en medios suplementados con glucosa 58 mM (●), frente a medios suplementados con glucosa 58 mM y sin AMP cíclico (■). Los valores son la media de tres réplicas.

4.1.2. Purificación de la UDPG-deshidrogenasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, se procedió a purificar la enzima a partir de un extracto libre de células, obtenido a partir de un cultivo de *X. albilineans* durante 24 h en medio Wilbrink, suplementado con sacarosa 58 mM e incluyendo en los extractos un cocktail inhibidor de proteasas tal y como se describió en Material y Métodos, apartados (3.2 y 3.4.).

De las 33 fracciones que se recogieron tras filtrar 10 mL de la muestra a través de la columna Dowex en alícuotas de 3 mL, tan sólo las 14 primeras fracciones (correspondientes a los mL 0 al 42) fueron significativas al valorar su contenido proteico (**Fig.36**).

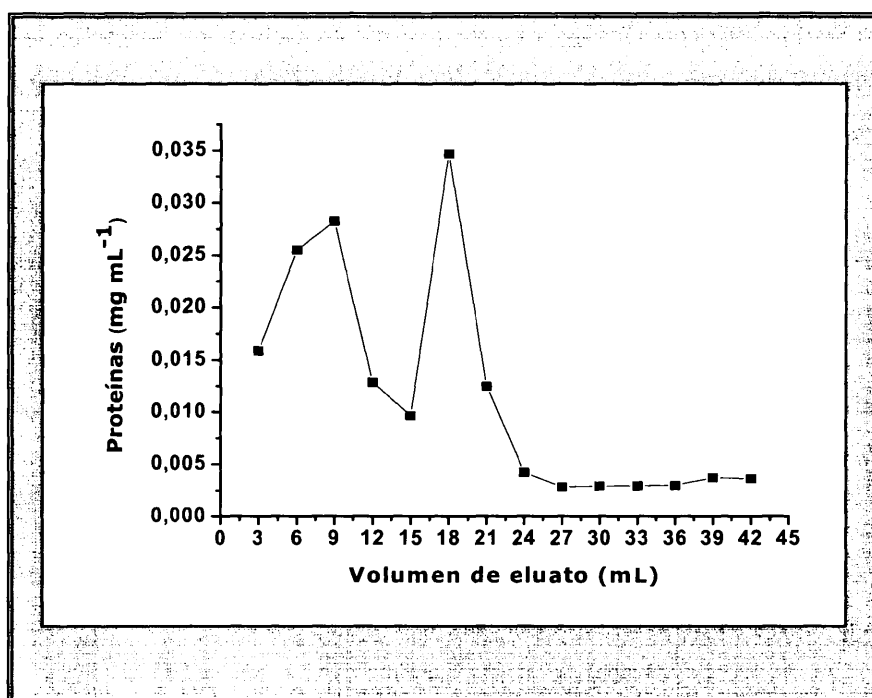


Figura 36: Variación del contenido proteico en las fracciones obtenidas a partir de un extracto libre de células tras la filtración a través de la columna Dowex.

La fracción número 13 fue la que presentó un mayor valor de actividad específica, medido en mg NADPH oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína. De acuerdo con estos resultados, la enzima UDPG-deshidrogenasa fue purificada 126 veces con una recuperación del 2,1% (Tabla IX).

Muestra	VoL(mL)	[Prot] (mg mL ⁻¹)	*[Prot total] (mg)	*A.E. (mU)	*A.T. (mU)	Purificación (veces)	Recupe- ración (%)
Extracto libre de células	24	0,24	5,78	39,6	229	0	100
Precipitado de la 2ª precipitación	44	0,04	1,72	56,8	97	1,43	42,35
Fracción 13 procedente de columna Dowex.	3	0,0003	0,01	5,0	4,8	126,40	2,1

* [prot total]=[proteína total]=[prot] (mg mL⁻¹) vol

* A.E.=actividad específica= mg NADPH mg prot⁻¹ min⁻¹

* A.T.=actividad total=Proteína total A.E.

Tabla IX: Purificación de la enzima UDPG-deshidrogenasa de *Xanthomonas albilineans*.

La enzima purificada fue analizada mediante Electroforesis Capilar en las condiciones descritas en el apartado 3.5.1. de Material y Métodos. Dicho análisis reveló un solo pico de tiempo de migración 32.44 min, el cual contenía 2,14 pg de proteína pura (**Fig.37 A**), lo cual indicaba que la proteína había sido purificada a homogeneidad. Se procedió a calcular el pI de la enzima mediante Electroforesis Capilar, interpolando el valor de movilidad electroforética en una recta patrón construida con proteínas de pI conocido tal y como se explica en el apartado 3.5.2 de Material y Métodos. El pI de la enzima UDPG-deshidrogenasa resultó ser de 8,98 (**Fig.37 B**). El peso molecular de la UDPG-dh se obtuvo de manera similar al cálculo del pI usando proteínas patrón de peso molecular conocido, tal y como se explicó en el apartado de 3.5.5 de Material y Métodos y fue estimado en 14,1 kDa (**Fig.37 C**).

4.1.3. Separación del ácido UDP-glucurónico producido durante la reacción de la UDPG sustrato mediante Electroforesis Capilar.

La verificación de que la proteína purificada era una auténtica UDPG-dh, requiere la identificación de UDP-GlcA como único producto de reacción.

4.1.3.1 Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad y Cromatografía Micelar Electrocinética.

Para llevar a cabo la detección de UDP-GlcA producido durante la reacción catalizada por la enzima UDPG-dh se procedió a utilizar la técnica de Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad, usando las condiciones de análisis explicadas en el apartado de Material y Métodos 3.5.3.1. Los patrones fueron disoluciones de UDPG y UDP-GlcA, ambas preparadas a concentraciones de 1,0 mg mL⁻¹ y 0,5 mg mL⁻¹, respectivamente. La detección de los patrones mediante esta técnica reveló un único pico, tanto para UDPG como para el UDP-GlcA cuando se prepararon a concentraciones de 1,0 mg mL⁻¹, con tiempos de migración de 4,067 min para la UDPG y de 4,125 min para el UDP-GlcA (**Fig.38 A y B**).

Se procedió a preparar los mismos patrones a una concentración de 0,5 mg mL⁻¹, obteniéndose un único pico para la UDPG, con un tiempo de migración de 4,050 min y de 4,133 min para el UDP-GlcA (**Fig.39 A y B**).

Finalmente, se preparó una mezcla de los patrones UDPG y UDP-GlcA, ambos a una concentración de 0,5 mg mL⁻¹, obteniéndose un único pico con un tiempo de migración de 4.154 min (**Fig.40**).

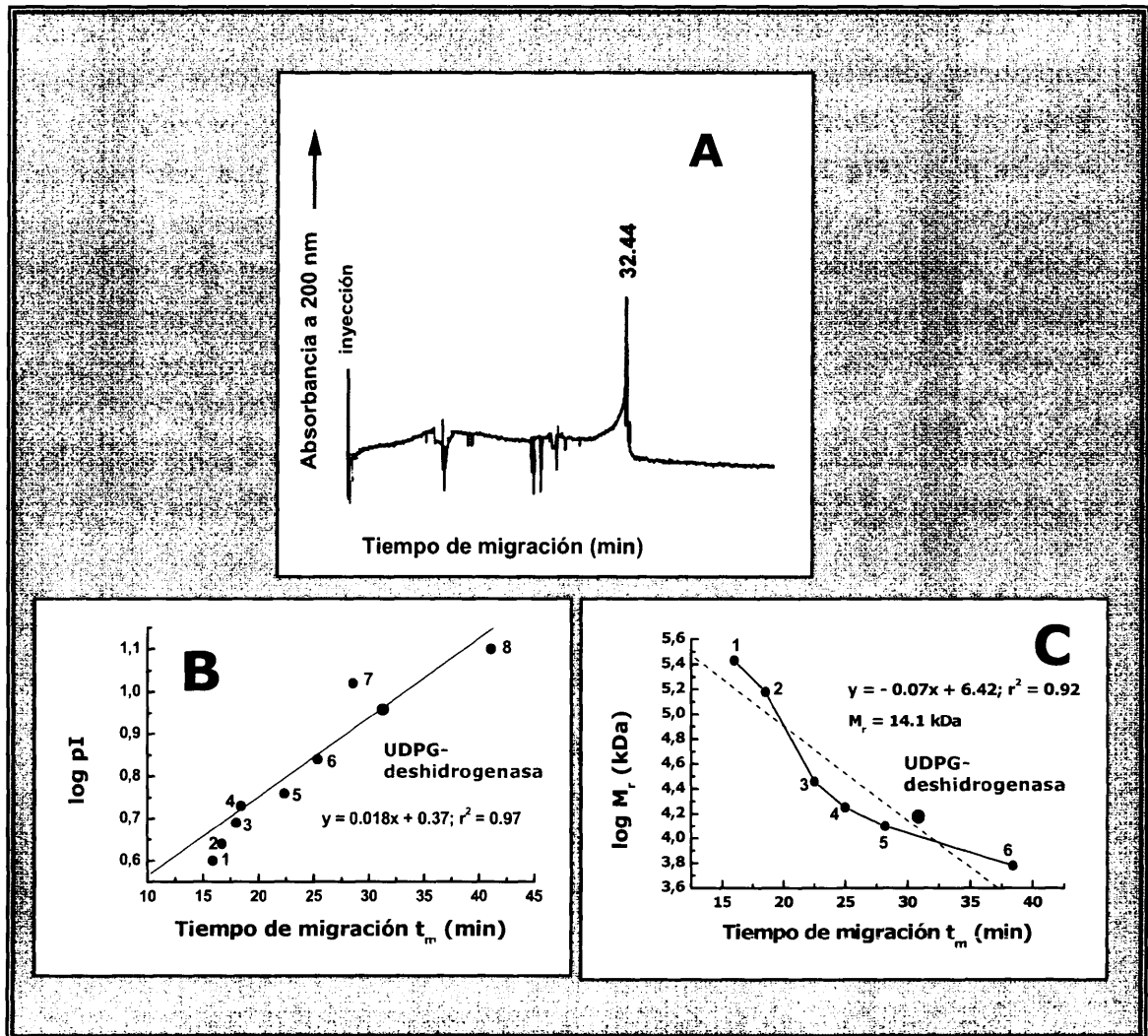


Figura 37: (A) Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar, de la enzima UDPG-deshidrogenasa de *Xanthomonas albilineans* donde se muestra un único pico con un tiempo de migración de 32,44 min. La detección se realizó a 200nm. (B) Análisis semilogarítmico a partir de valores de pI conocidos pertenecientes a una serie de proteínas patrón frente a tiempos absolutos de migración en electroforesis capilar, donde 1=invertasa de levadura con un (pI 4,0); 2=ferritina de caballo con un (pI 4,4); 3=albúmina bovina con un (pI 4,9); 4= alcohol deshidrogenasa con un(pI 5,4); 5=anhidrasa carbónica con un (pI 5,8); 6=mioglobina con un (pI 7,0); 7=citocromo c con un (pI 10,6); y 8=invertasa purificada procedente del liquen *Evernia prunastri* con un (pI 13,0). (C) Representación semilogarítmica de la relación entre el logaritmo del peso molecular de varias proteínas patrón frente a tiempos de migración absolutos en electroforesis capilar, donde 1=catalasa (240 kDa); 2=alcohol deshidrogenasa (150 kDa); 3=anhidrasa carbónica (29 kDa); 4=mioglobina (17,8 kDa); 5=citocromo c (12,5 kDa) y 6=ferredoxina de espinaca (6 kDa).

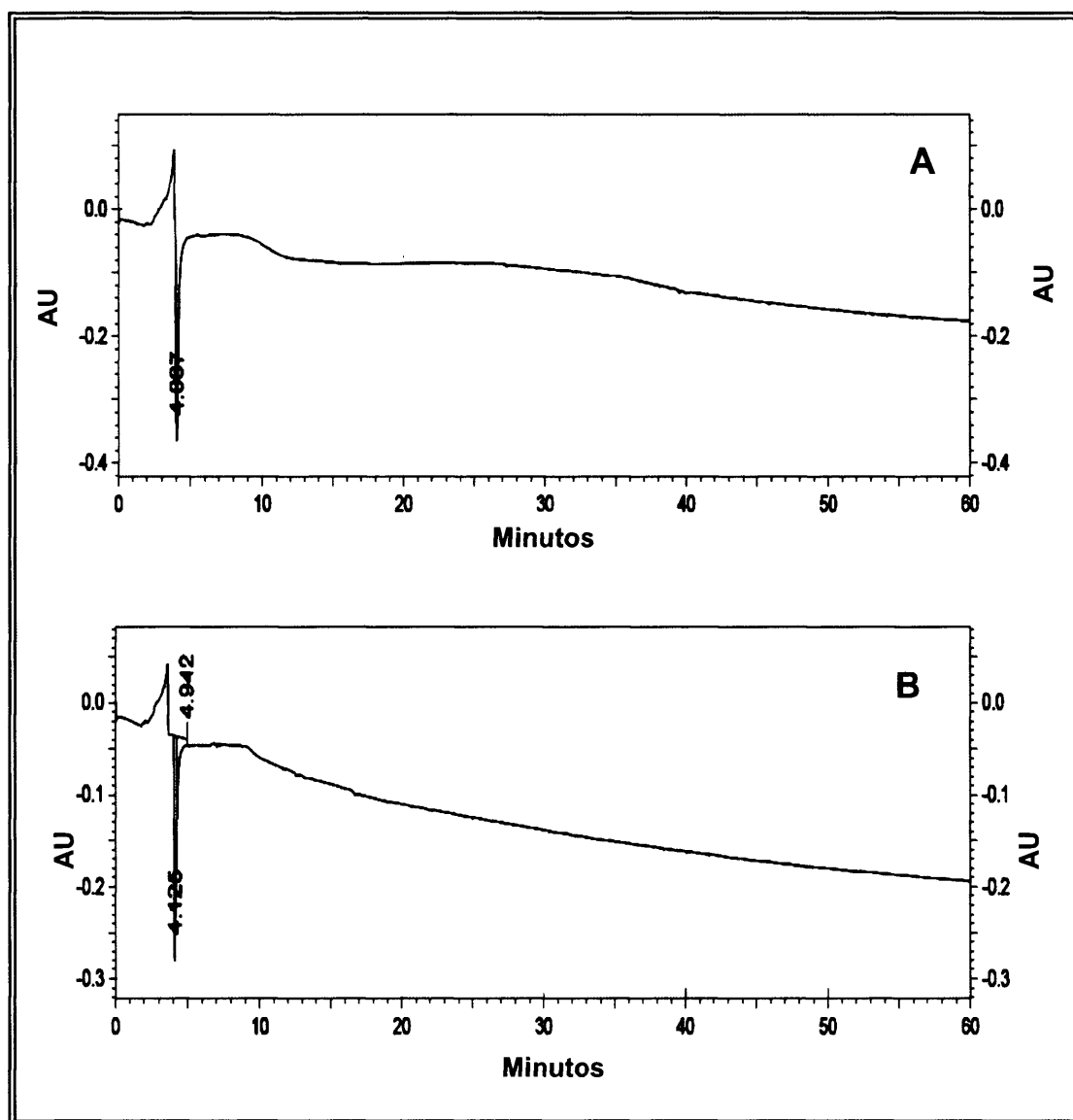


Figura 38: (A) Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad cátodo-ánodo a partir de muestra patrón de UDP-glucosa preparada a una concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm . (B) Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar con detección indirecta y reversión de la polaridad cátodo-ánodo a partir de una muestra patrón de ácido UDP-glucurónico preparada a una concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm .

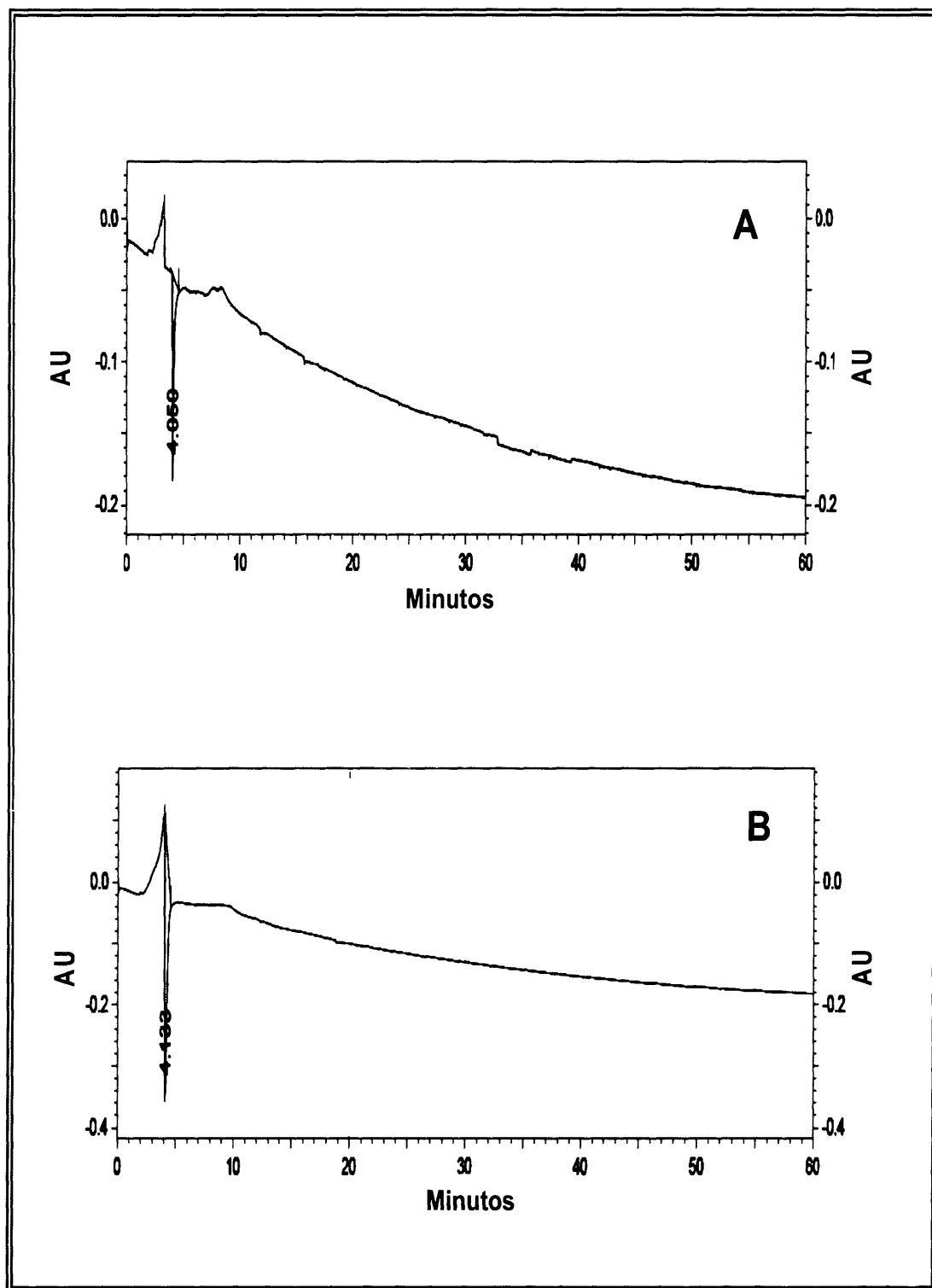


Figura 39: (A) Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar con detección indierca y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una muestra patrón de UDP-glucosa preparada a una concentración de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm . (B) Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar con detección indiercat y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una muestra patrón de ácido UDP-glucurónico preparada a una concentración de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm .

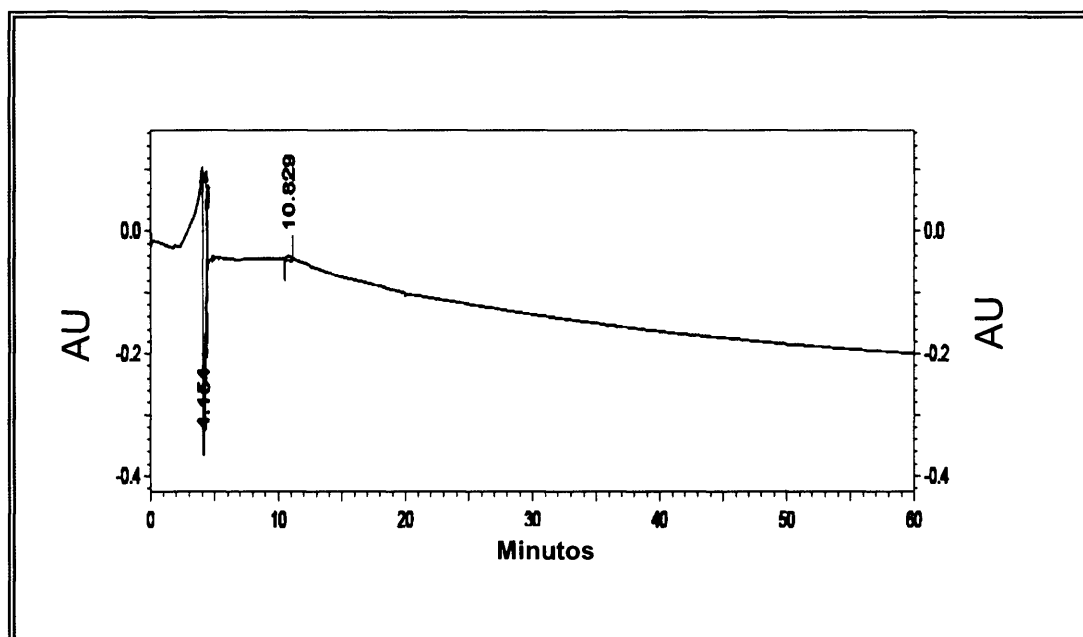


Figura 40: Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar con detección indierca y reversión de la polaridad (cátodo-ánodo) a partir de una mezcla de patrones de UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico a una concentración de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm.

No se obtuvieron picos significativos cuando se analizaron controles de la reacción catalizada por la UDPG-dh en mezclas de reacción preparadas en ausencia de sustrato (UDPG) y tampoco cuando se analizaron los componentes a partir de una verdadera mezcla de reacción, conteniendo sustrato, enzima y cofactor (no se muestran los resultados).

Puesto que los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que no se obtuvo una verdadera separación de picos cuando se analizaron los patrones (UDPG y UDP-GlcA) y el análisis de los controles y de las reacciones tampoco fueron determinantes, se procedió a analizar nuevamente las muestras mediante la técnica de Cromatografía Micelar Electrocinética mediante la adición del agente surfactante SDS, tal y como quedó explicado en el apartado de Material y Métodos 3.5.3.2.

Los patrones se prepararon a una concentración de 1 mg mL^{-1} , y la detección mediante esta técnica reveló 2 picos importantes para la UDPG con tiempos de migración de 6,125 min y 8,6 min (**Fig. 41A**), pudiéndose interpretar el primer pico como una micela formada por UDPG+SDS y el segundo pico siendo únicamente UDPG.

El análisis obtenido del ácido UDP-glucurónico, reveló un pico importante con tiempo de migración de 14,092 min. El pico con un tiempo de migración de 6,72 min podría tratarse de una micela formada por SDS (**Fig.41 B**). Cuando se analizaron mediante esta técnica las mezclas de patrones preparadas a una concentración de 1 mg mL^{-1} , se obtuvieron 3 picos relevantes con tiempos de migración de 6,4 min,

8,73 min y 12,3 min, repectivamente (**Fig.41 C**). El primer pico podría interpretarse como una micela formada por UDPG, UDP-GlcA y el SDS. El segundo pico obtenido con tiempo de migración de 8,73 min podría corresponderse a UDPG libre. El tercer pico obtenido podría tratarse de UDP-GlcA, equivalente al pico obtenido con tiempo de migración de 14,092 cuando se analizó de manera independiente (**Fig.41 B**).

Cuando se procedió al análisis de los controles de reacción (sin UDPG) y de las reacciones (conteniendo sustrato, enzima y cofactor), se obtuvieron electroferogramas diferentes. El control de la reacción aparece representado en la **Fig. 42 A** y su correspondiente análisis a partir de una mezcla de reacción aparece representado en la **Fig. 42 B**. El pico obtenido tras el análisis, con un tiempo de migración de 15,97 min, podría ser UDP-GlcA, si se compara con su respectivo patrón con tiempo de migración de 14,092 min, representado en la **Fig 41 B**.

No obstante, los resultados obtenidos mediante esta técnica de Cromatografía Micelar Electrocinética no fueron lo suficientemente claros para dilucidar la separación de UDP-GlcA producido durante la reacción de la UDPG sustrato catalizada por la enzima UDPG-dh. Por ello, se decidió llevar a cabo un último ensayo aplicando la técnica de Electroforesis Capilar con polaridad ánodo-cátodo.

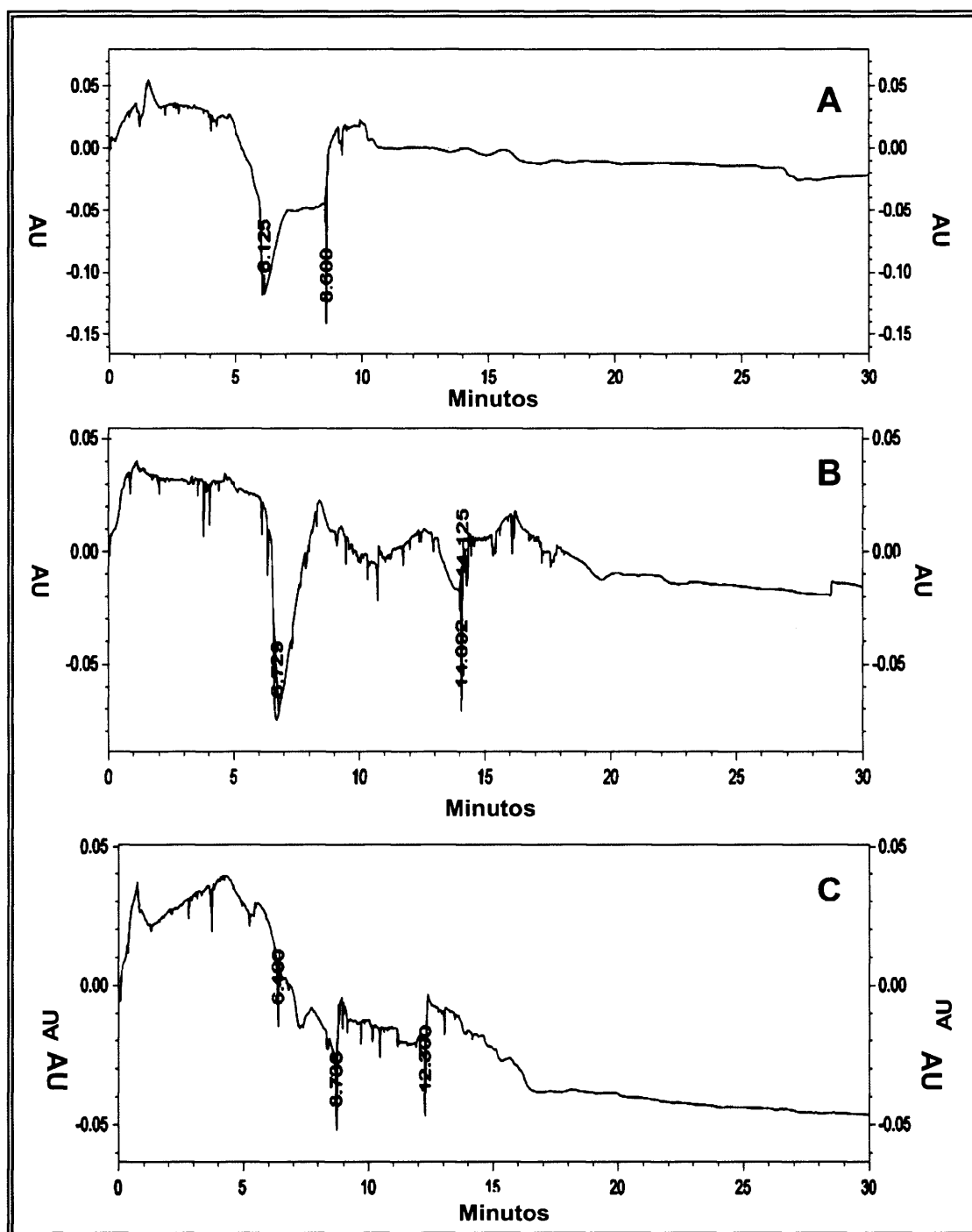


Figura 41: (A) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una muestra patrón de UDP-glucosa preparada a concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm. (B) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una muestra patrón de ácido UDP-glucurónico preparada a una concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm. (C) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una mezcla de patrones preparados a una concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. La detección se realizó a 214 nm.

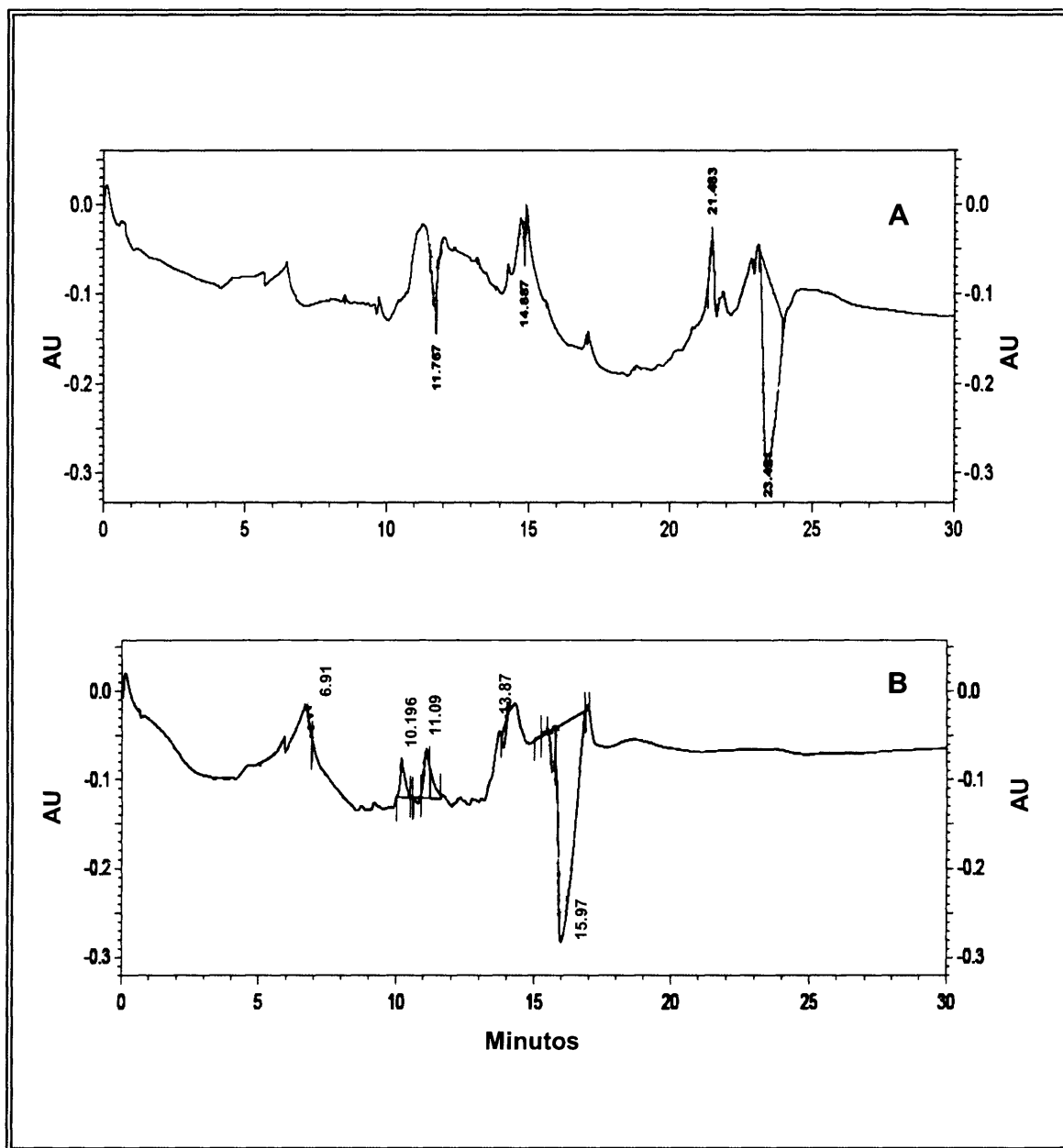


Figura 42: (A) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una muestra control de reacción (sin UDP-glucosa). La detección se realizó a 214 nm. (B) Electroferograma obtenido mediante Cromatografía Micelar Electrocinética a partir de una muestra de reacción (conteniendo el sustrato de la reacción, enzima y cofactor). La detección se realizó a 214 nm.

4.1.3.2 Separación electroforética con polaridad ánodo-cátodo.

Una disolución de UDPG, a una concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, tal y como queda explicado en el apartado 3.5.3.3 de Material y Métodos, fue empleada como patrón para la separación por Electroforesis Capilar. Su detección reveló un único pico con un tiempo de migración de 4,70 min. UDP-GlcA, preparado a la misma concentración, produjo un único pico en este caso con un tiempo de migración de 5,76 min (No se muestran los electroferogramas).

Ambos compuestos fueron separados a partir de una mezcla de los mismos, mostrando idénticos tiempos de migración a los obtenidos por separado (**Fig. 43 A**). Las mismas muestras, preparadas a una concentración de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, produjeron picos en Electroforesis Capilar con tiempos de migración de 4,26 min para la UDPG y 5,25 min para el UDP-GlcA, tiempos algo más cortos que los obtenidos en el caso anterior (**Fig.43 B**). De un control de la reacción catalizada por UDPG-dh, preparado en ausencia de sustrato (UDPG), no se obtuvo ningún pico identificativo (**Fig.43 C**), mientras que la separación de los componentes a partir de una verdadera mezcla de reacción, conteniendo sustrato, enzima y cofactor, reveló un pico principal con un tiempo de migración de 6,27 min (**Fig.43 D**), el cual fue identificado como UDP-GlcA. Parte de la UDPG que no se transformó en la reacción catalizada por la enzima UDPG-dh quedó reflejada en un pico con tiempo de migración de 4,88 min. De esta forma, la conversión catalítica de la UDPG por la acción de la enzima UDPG-dh en presencia de oxígeno y NADPH, realmente produjo UDP-GlcA.

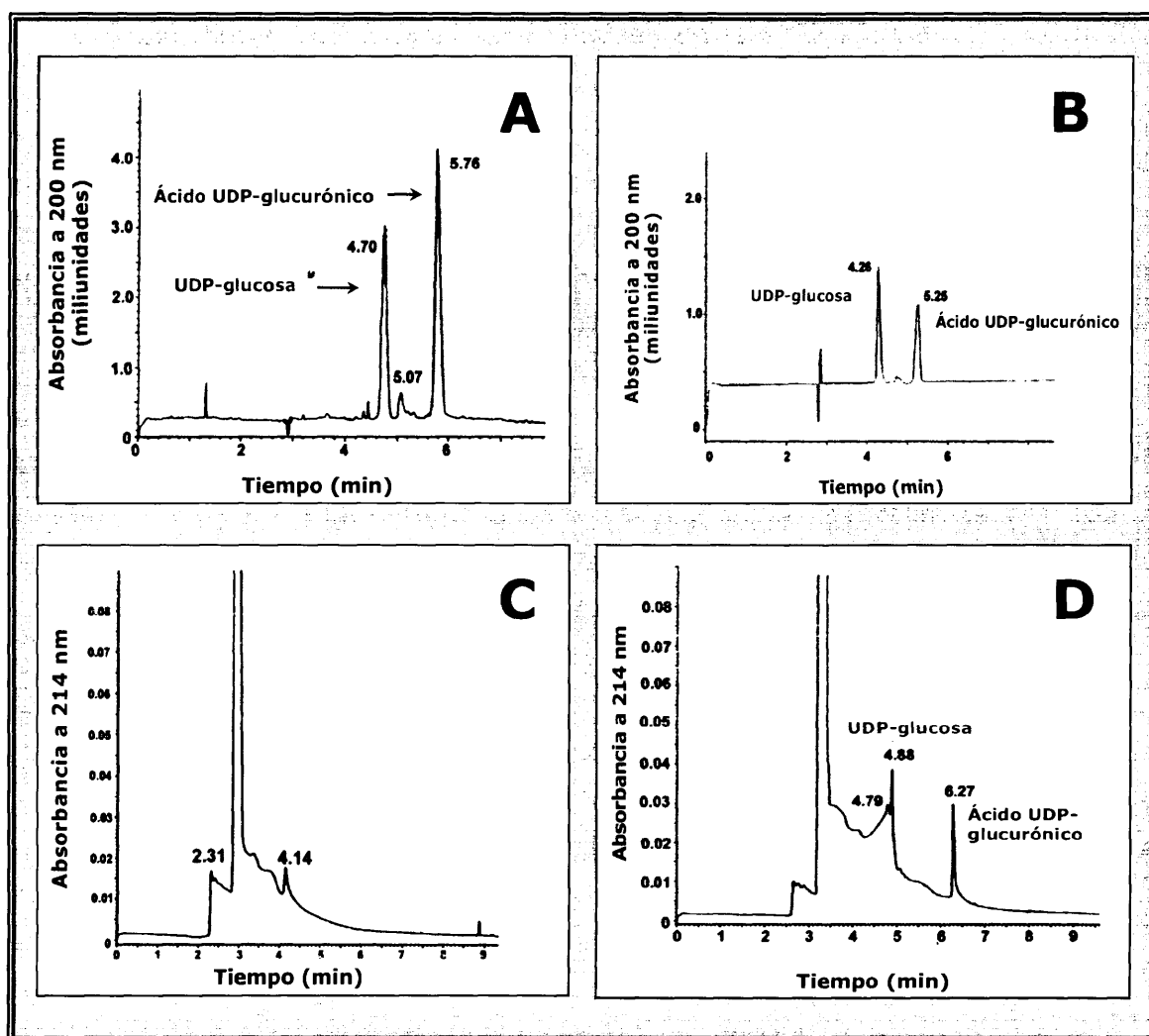


Figura 43: (A): Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar a partir de una mezcla de UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico preparados a una concentración de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ cada uno. La detección se realizó a 200 nm. (B): Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar a partir de una mezcla de UDP-glucosa y ácido UDP-glucurónico preparados a una concentración de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ cada uno. La detección se realizó a 200 nm. (C): Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar del control de la reacción enzimática sin la adición del sustrato UDP-glucosa. La detección se realizó a 214 nm. (D): Electroferograma obtenido mediante electroforesis capilar de la mezcla de reacción pasados 30 minutos de contacto entre la enzima UDPG-deshidrogenasa con los sustratos (UDP-glucosa y oxígeno) y el coenzima (NADPH).

4.1.4. Caracterización de la enzima UDPG-deshidrogenasa.

La cinética de saturación de la enzima por UDPG fue hiperbólica, típica de una enzima micaliana, pero la enzima fue inhibida por concentraciones de UDPG superiores a $1,3 \text{ mM}$ (Fig.44 A).

El valor de la K_m para UDPG fue calculado en 0,87 mM, deducido del análisis de la representación doble recíproca efectuado (**Fig. 44 B**). La dependencia de suministro de oxígeno de la velocidad de reacción mostró ser lineal tal y como se observa en la **Fig.44 C**, variándose el tiempo de suministro de oxígeno en la mezcla de reacción desde 5 hasta 30 min para un tiempo total de reacción de 30 min.

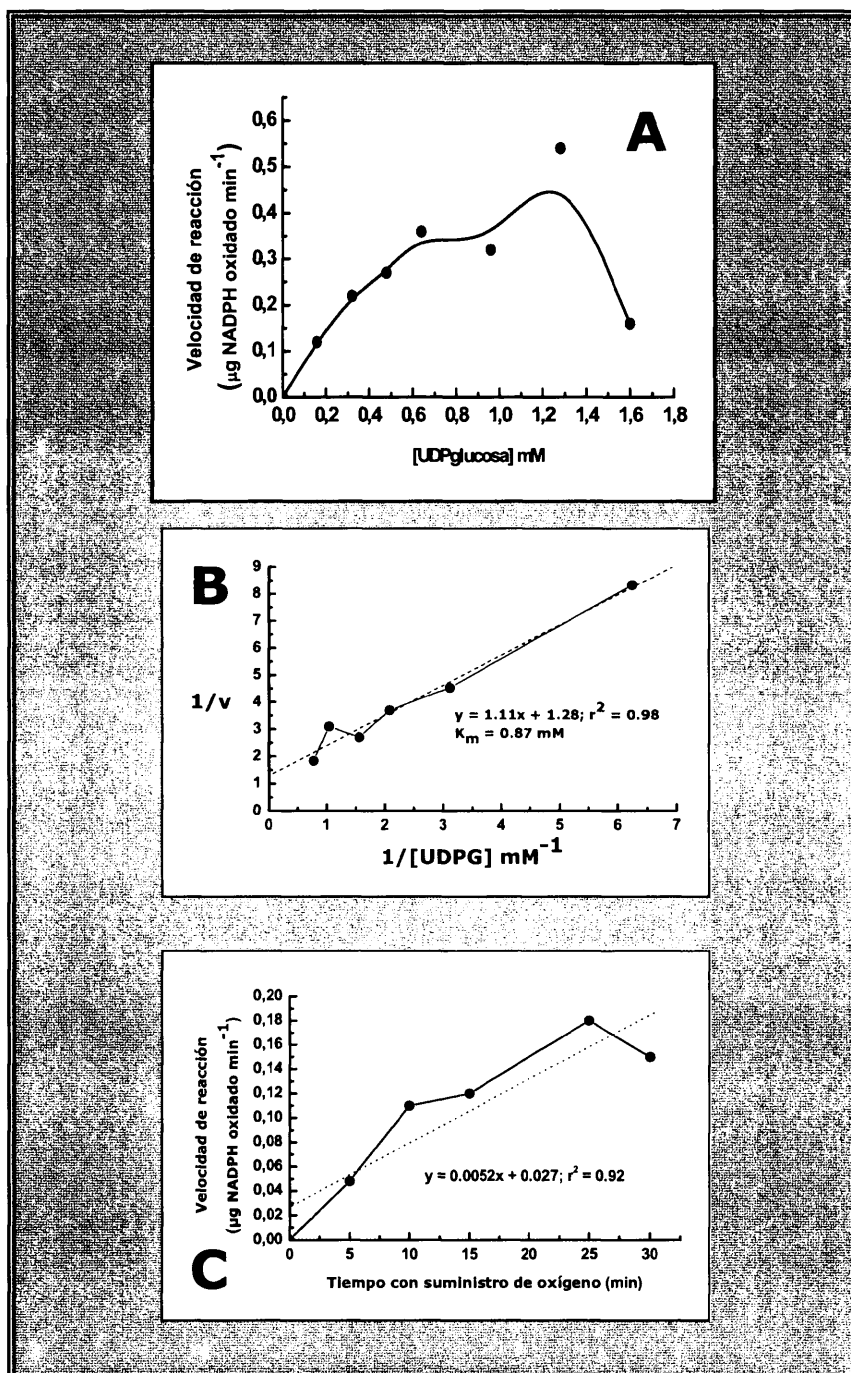


Figura 44: (A) Representación directa de la cinética de saturación de UDPG- deshidrogenasa por UDP-glucosa. (B) Cálculo del valor de la K_m de la enzima UDPG-deshidrogenasa mediante el análisis de doble recíproca. (C) Representación de la relación entre la velocidad de reacción de la enzima UDPG-deshidrogenasa frente a diferentes tiempos con suministro de oxígeno.

Resultados

Además, la velocidad de reacción se saturó para concentraciones de NADPH superiores a 0,2 mM (**Fig.45 A**), obteniéndose unos valores de K_m para el cofactor de 0,30 mM (**Fig.45 B**). El coeficiente de interacción (n_H) de la enzima con NADPH fue estimado mediante la representación de Hill, siendo de 3, tal y como se muestra en la (**Fig.45 C**). Según estos datos obtenidos, podemos afirmar que la enzima UDPG-dh se comporta como una enzima alostérica en su interacción con el NADPH.

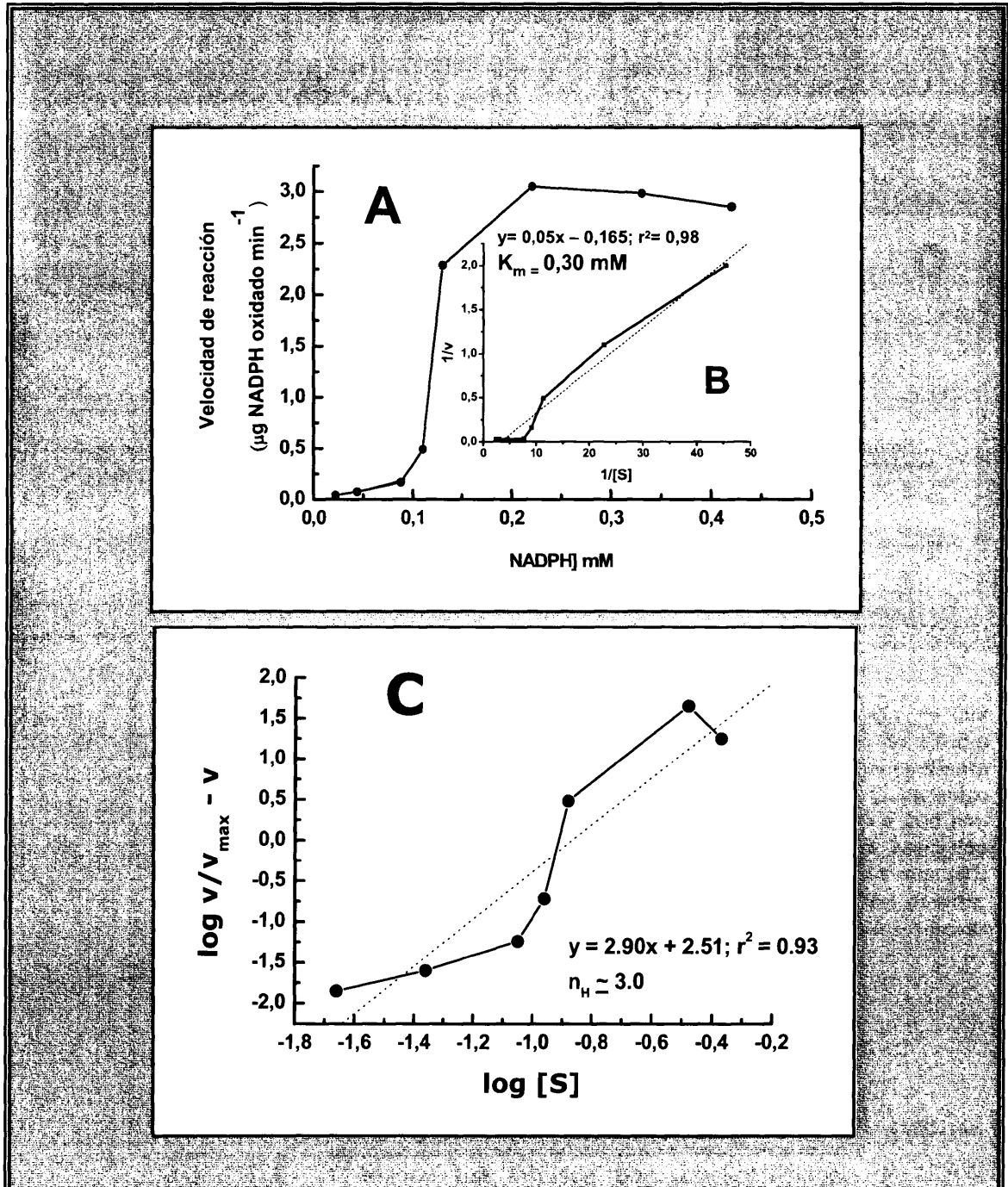


Figura 45: (A) Cinética de saturación de sustrato de la UDPG-deshidrogenasa con diferentes concentraciones del cofactor NADPH. (B) Cálculo del valor de la K_m para el cofactor NADPH mediante el análisis de doble recíproco. (C): Cálculo del coeficiente de interacción de la UDPG-deshidrogenasa con el NADPH.

Además, se ensayó la actividad enzimática para un rango de valores de pH que oscilaron entre 3,0 y 9,0, siendo el pH 6,8 el óptimo para la reacción de oxidación (**Fig. 46 A**). Igualmente se ensayó el valor de la temperatura óptima de la reacción enzimática utilizando valores de temperatura comprendidos entre 4°C y 90°C, siendo la temperatura óptima de la reacción de 37°C (**Fig. 46 B**).

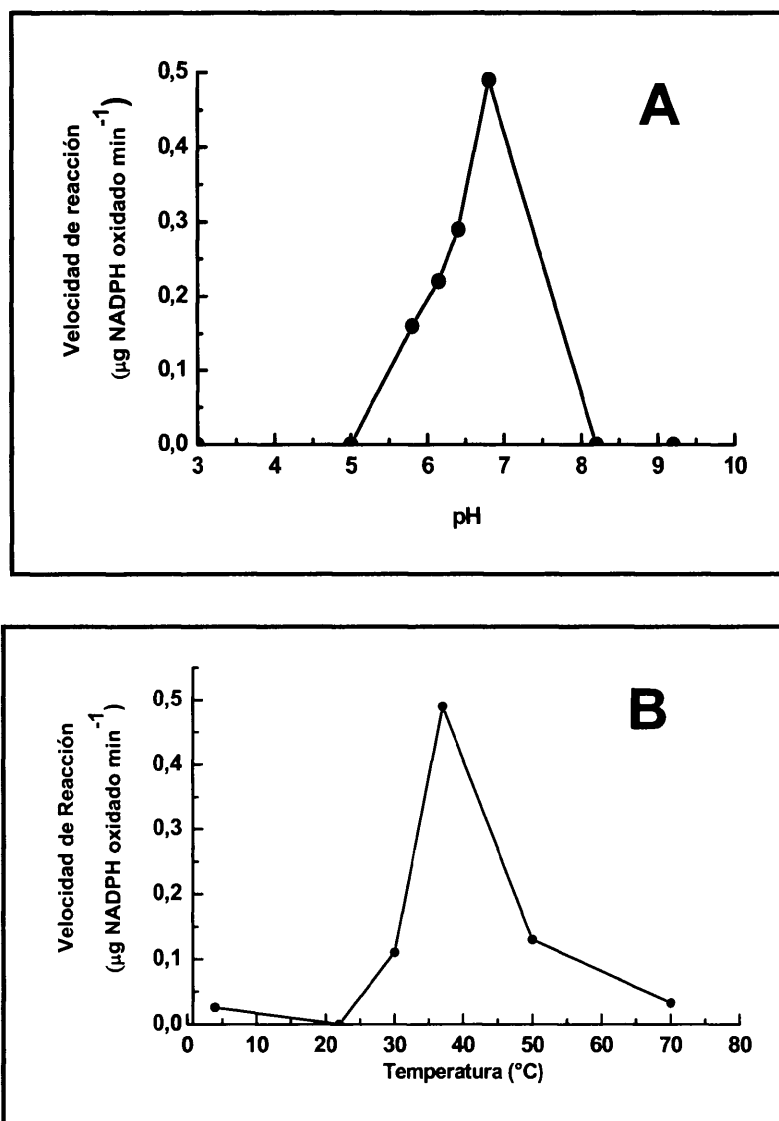


Figura 46: (A) Dependencia de la actividad de la enzima UDPG-deshidrogenasa sobre diferentes valores de pH utilizados en la mezcla de reacción. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas. (B) Dependencia de la actividad de la enzima UDPG-deshidrogenasa sobre diferentes valores de temperatura utilizados durante la reacción. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

Resultados

Con la enzima purificada a homogeneidad, se analizó la secuencia N-terminal de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.6.4. de Material y Métodos. Esta secuencia, deducida de las mayores concentraciones de un aminoácido particular en las muestras digeridas sucesivamente, resultó ser: **I** (Isoleucina), **Q** (Glutamina), **P** (Prolina), **Y** (Tirosina), **N** (Asparagina), **H** (Histidina) tal y como se indica en la **Tabla X**.

AA	1	2	3	4	5	6					
D	10,69	17,28	1,61	22,78	1,32	23,22	1,01	21,94		17,83	
N	4,68	7,64	1,63	10,97	1,43	9,58		12,23	1,28	7,95	
S	19,12	10,63		11,97	1,12	12,10	1,01	15,32	1,27	9,50	
Q	1,89	18,28	5,44	12,78	1,24	10,93		12,74	1,22	11,15	
T	8,75	22,12	2,53	26,06	1,18	24,01		26,38	1,10	17,98	
G	21,01	16,50		24,92	1,81	24,05		24,60		22,22	
E	20,94	20,58		29,18	1,42	31,33	1,07	28,31		25,85	
H	1,81	2,42	1,34	3,27	1,35	3,07		3,25		4,26	1,31
A	51,96	32,12		39,58	1,23	26,71		25,85		22,16	
R	11,62	21,49	1,85	27,81	1,29	20,06		19,17		17,84	
Y	5,98	5,59		6,32	1,13	7,99	1,26	6,47		4,87	
P	2,95	3,95	1,34	15,84	4,01	15,34		14,51		15,91	1,09
M	6,97	2,28		2,6	1,14	2,68	1,03	3,30	1,23	2,60	
V	67,49	30,57		29,37		19,68		20,91		16,96	
F	29,81	14,94		11,32		7,02		7,40		6,41	
I	67,98	38,31		26,48		15,69		14,11		13,17	
K	7,89	30,54	3,87	30,00		21,54		21,30		23,17	1,09
L	64,53	33,40		22,21		14,80		17,85	1,21	18,54	1,07
IOPYNH											

Tabla X: Análisis de la secuencia N-terminal de la enzima UDPG-deshidrogenasa deducida de acuerdo con la máxima concentración de un aminoácido particular obtenido tras sucesivas digestiones enzimáticas. El valor indicado en la segunda subcolumna para cada columna de orden indica el incremento relativo en la concentración de cada aminoácido respecto al obtenido en la digestión secuencial previa (valores 2/1, 3/2 etc).

4.2. PAPEL DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR Y EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa.

Para verificar la posible acción de las glicoproteínas de caña de azúcar, HMMG y MMMG, en la virulencia de *X. albilineans*, se cultivó dicho microorganismo en medio Wilbrink líquido al que se adicionó HMMG y MMMG, obtenidos de tallos de caña de azúcar de la variedad Barbados, de 22 meses de edad, siendo esta variedad altamente sensible a la escaldadura foliar.

En determinados ensayos se adicionó al medio de cultivo 8-azaguanina a una concentración de 0,1 mM (inhibidor transcripcional) o cloranfenicol a una concentración de 0,1 mM (inhibidor traduccional). Los cultivos en medio Wilbrink líquido control o conteniendo HMMG y MMMG, fueron también modificados mediante la adición al medio de piperina, un inhibidor específico de la UDPG dh, tal y como aparece detallado en el apartado 3.9 de Material y Métodos. A continuación se detallan los resultados obtenidos en el experimento.

La actividad enzimática de la UDPG-dh mostró un notable descenso durante las primeras 15 h en los cultivos control; pasado este tiempo, los valores de actividad enzimática se mantuvieron constantes hasta las 24 h (**Fig.47A**).

La pérdida inicial de la actividad de la UDPG-dh se volvió a producir en cultivos de la bacteria *X. albilineans* inoculada en medio Wilbrink líquido suplementado con HMMG. Sin embargo, transcurridas las 15 h, se produjo un incremento exponencial de la actividad enzimática que se mantuvo hasta las 24 h de cultivo (**Fig.47 A**). Sin embargo, cuando la bacteria fue cultivada en medio Wilbrink líquido suplementado con MMMG, no se produjo la pérdida inicial de la actividad enzimática como ocurría en los casos anteriores. En este caso la actividad incrementó notablemente hasta el último día de cultivo (**Fig.47 A**). La variación del contenido proteico obtenido en estas condiciones queda representado en la **Fig 47 B**. La adición de HMMG o MMMG al medio de cultivo Wilbrink líquido mantiene la producción de las proteínas mientras que el crecimiento bacteriano se mantenga constante. Se detectó una pérdida muy acusada de proteínas totales cuando se cuantificaron en cultivos control únicamente constituidos por medio Wilbrink líquido y la bacteria (**Fig.47 B**).

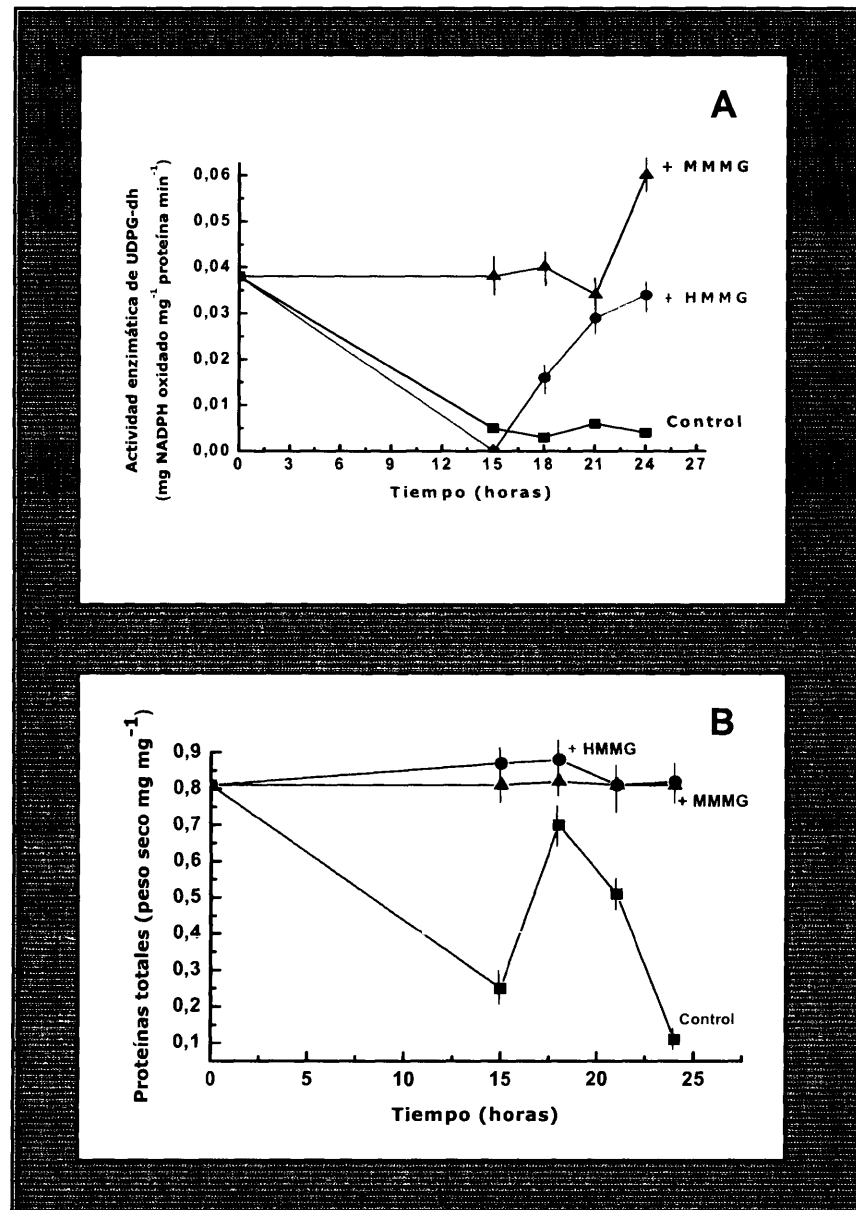


Figura 47: (A) Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de *Xanthomonas albilineans* cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG ó MMMG procedente de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas. (B) Variación del contenido proteico obtenido a partir de extractos libres de células después del cultivo. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

Cuando se adicionó 8-azaguanina (inhibidor del proceso de transcripción) a los medios de cultivo, la actividad inicial de la enzima UDPG-dh se mantuvo constante durante todo el tiempo de cultivo, incluso cuando el medio fue suplementado con HMMG ó MMMG, aunque los valores de actividad obtenidos al adicionar las glicoproteínas de caña de azúcar a dicho medio fueron ligeramente superiores a los valores obtenidos cuando se adicionó únicamente el inhibidor transcripcional (**Fig. 48**). Cuando se incluyó cloranfenicol (inhibidor del proceso de la traducción) en los medios de cultivo, únicamente las MMMG muestran competir por el incremento de la producción enzimática a las 24 h (**Fig.49**). Ambos inhibidores (cloranfenicol y 8-azaguanina), anulan la pérdida de la actividad enzimática de la UDPG dh en ausencia de las glicoproteínas de caña de azúcar, tal y como aparece representado en la **Fig.50**, en la que se muestran los valores de actividad enzimática de los cultivos en presencia de ambos inhibidores (8-azaguanina y el cloranfenicol) frente al control sin adición de dichos inhibidores.

La actividad enzimática de la UDPG-dh fue completamente inhibida cuando se suministraron concentraciones de 8-azaguanina y cloranfenicol a una concentración de 300 μM (estos datos no aparecen representados).

Cuando se adicionó 0,03 mM de piperina (inhibidor específico de la UDPG-dh NAD^+ -dependiente) al medio de cultivo conteniendo a su vez HMMG ó MMMG, se obtuvieron resultados diferentes a los esperados, ya que la actividad de la enzima UDPG-dh se mantuvo estable sin ningún tipo de variación (**Fig.51**).

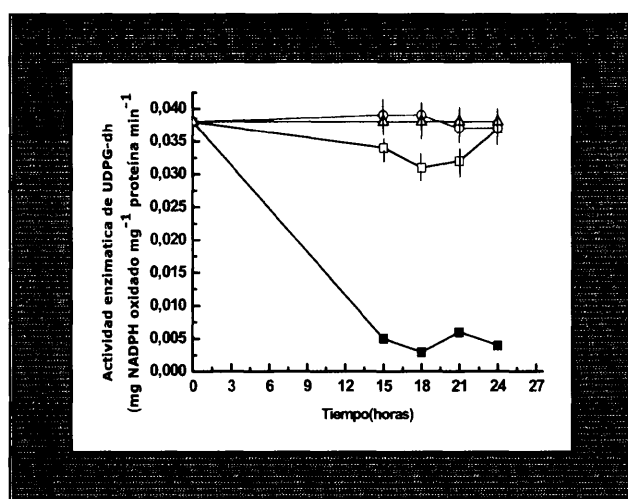


Figura 48: Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de la bacteria *Xanthomonas albilineans* cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG+8-azaguanina (○) ó MMMG+8-azaguanina (Δ) y los controles sin 8-azaguanina (■) y con 8-azaguanina (□), procedentes de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

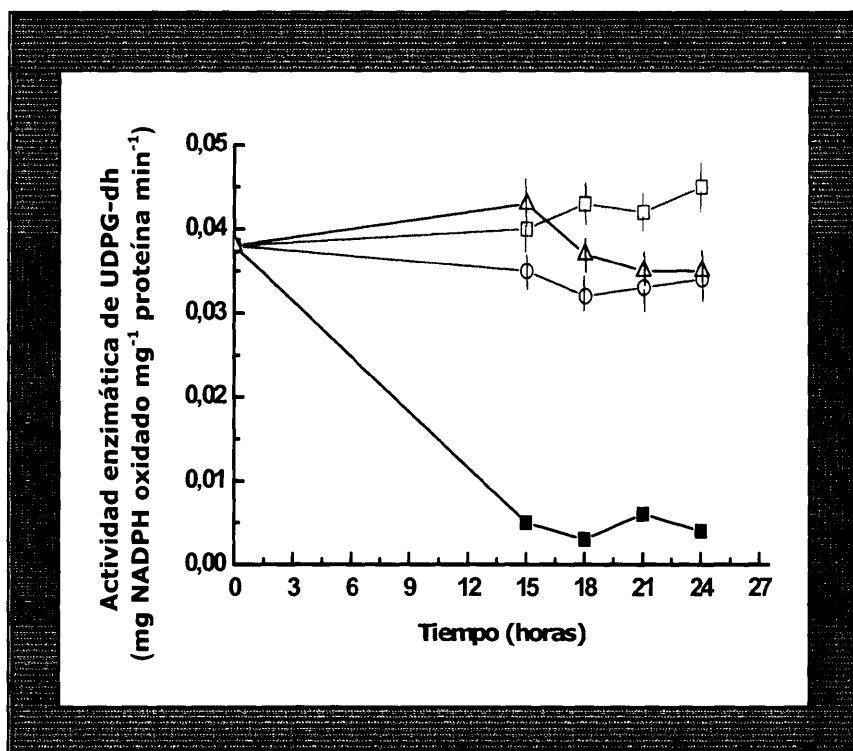


Figura 49: Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de la bacteria *Xanthomonas albilineans* cultivada en medio Wilbrink líquido con HMMG+cloranfenicol (O) ó MMMG+cloranfenicol (Δ) y los controles sin cloranfenicol (■) y con cloranfenicol (□), procedentes de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

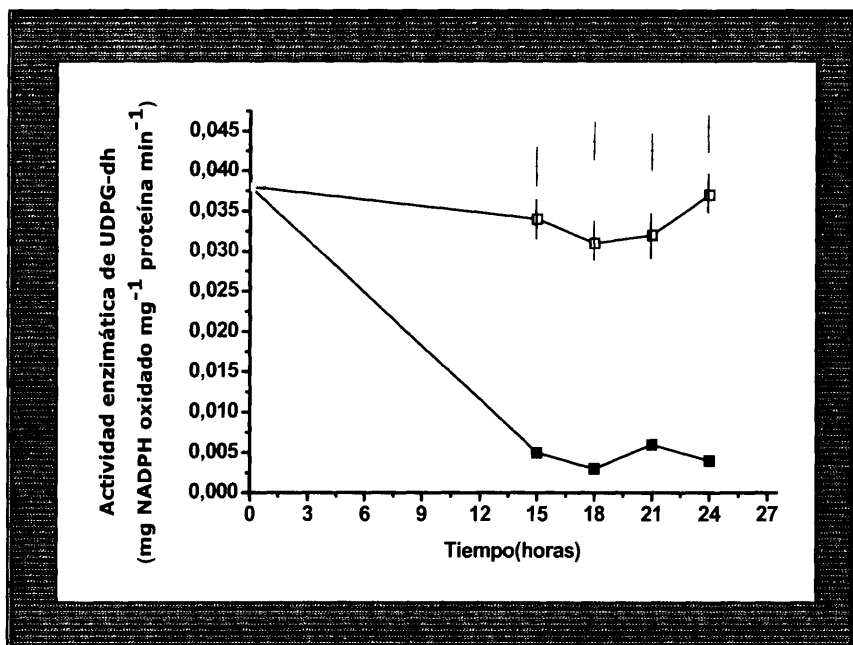


Figura 50 Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de *Xanthomonas albilineans* cultivada en medio Wilbrink líquido con 8-azaguanina (□), con cloranfenicol (□) ó sin ningún inhibidor (■). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

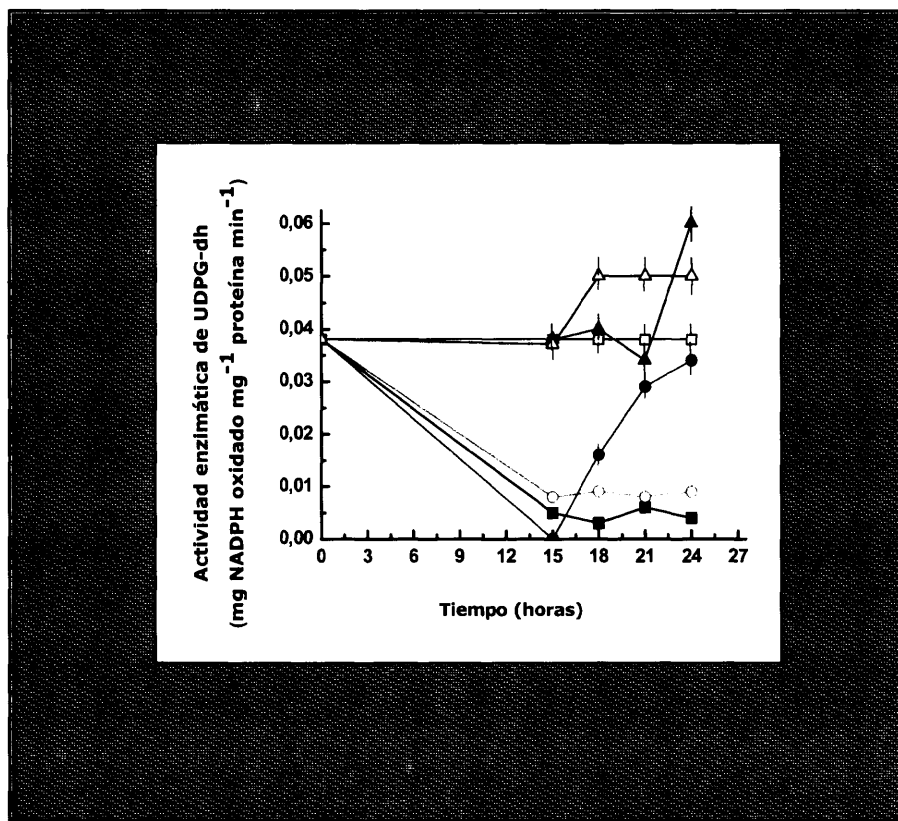


Figura 51: Variación de la actividad enzimática de la UDPG-deshidrogenasa de *Xanthomonas albilineans* cultivada en medio Wilbrink con HMMG (●), HMMG+piperina (○), MMMG (▲), MMMG+piperina (△), control (■) y control+piperina (□), procedente de caña de azúcar de la variedad Ba 42231 de 22 meses de edad. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

Se llevó a cabo un último ensayo de medida de inhibición de la actividad proteasa bacteriana con HMMG y MMMG, siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.10.5 de Material y Métodos. Para ello, extractos libres de células de la bacteria que mostraron actividad proteasa, fueron preincubados durante 5 min con HMMG ó MMMG obtenidas a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de plantas sanas e inoculadas, revelándose una inhibición variable de la actividad proteasa frente a la caseína (sustrato de la reacción). Las HMMG procedentes de plantas sanas no inhibieron prácticamente a las proteasas bacterianas, aproximadamente un 33 % de inhibición fue detectado cuando se utilizaron HMMG procedentes de plantas inoculadas con la bacteria. Sin embargo, las MMMG obtenidas de plantas sanas produjeron un efecto inhibitorio similar o ligeramente superior al obtenido tras la utilización de las mismas glicoproteínas pero obtenidas de plantas enfermas (**Fig. 52**).

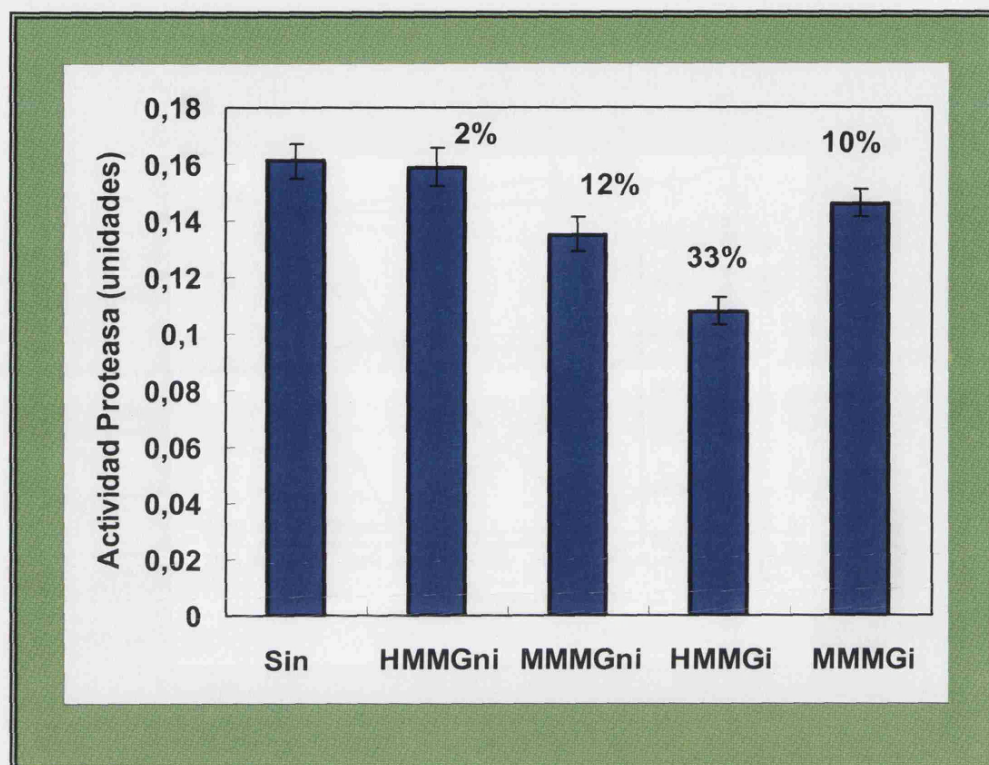


Figura 52: Inhibición de la actividad proteasa bacteriana por las HMMG y MMMG aisladas a partir de segmentos de caña de azúcar no inoculados con la bacteria (ni) e inoculados (i). Sin, indica sin preincubación. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

De este estudio puede deducirse que la UDPG-dh de *X.albilineans* es una enzima preexistente, constitutiva, sensible a proteasas, cuya actividad se desarrolla solo en el caso de que las proteasas bacterianas no se produzcan o estén inhibidas por factores externos.

4.3. ESTUDIO DEL XANTANO PRODUCIDO POR *Xanthomonas albilineans* OBTENIDO TRAS LA INFECCIÓN DE TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR.

La inoculación experimental llevada a cabo en segmentos de tallos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 con la bacteria *X. albilineans*, produjo cambios importantes en el patrón de la producción de los polisacáridos de caña de azúcar.

Segmentos de caña de azúcar, de 9 cm de longitud, fueron inoculados con 100 μ L de una suspensión de células de *X. albilineans* después de ser cortados y se mantuvieron durante un tiempo máximo de 9 días a temperatura ambiente. Cada día, dos segmentos (uno control y otro inoculado), fueron mecánicamente molidos para obtener sus correspondientes jugos. Este proceso se repitió de la misma manera hasta el día noveno siguiendo el mismo protocolo explicado de forma detallada en el apartado 3.10.1 de Material y Métodos.

Una mezcla de polisacáridos, incluyendo la fracción glicídica de HMMG y MMMG, fueron obtenidos tras la filtración a través de una columna de Sephadex G-10 conectada en serie con una columna de Sephadex G-50 tal y como queda explicado en el apartado 3.10.1 de Material y Métodos. Las fracciones que contenían HMMG eluyeron en los mL 71 al 101, mientras que las MMMG eluyeron desde el mL 102 al 182. Posteriormente, se valoró la cantidad de azúcares en cada fracción mediante el método de Dubois *et al.*, (1956) como se explicó en el apartado 3.8.1 de Material y Métodos. Los resultados obtenidos tras esta medida quedan reflejados en la **Fig. 53A**. La máxima cantidad de HMMG procedente de segmentos de caña sanos (sin inocular con la bacteria), se obtuvo en el día sexto del experimento, coincidiendo con el valor mínimo de MMMG recuperado. A partir de este día, la cantidad de HMMG obtenida disminuyó mientras que los valores obtenidos para MMMG aumentaron discretamente, sujetos a ciertas oscilaciones (**Fig.53A**).

Sin embargo, el patrón de elución obtenido correspondiente a los segmentos de tallos de caña de azúcar previamente inoculados con la bacteria *X. albilineans*, fue muy diferente. Se produjo un desplazamiento en el perfil de elución de las HMMG, obteniéndose los valores más altos en el noveno día de tratamiento, mientras que los valores obtenidos para las MMMG sufrieron oscilaciones, produciéndose además un desplazamiento de 24 h respecto al valor máximo obtenido en comparación con el tratamiento control (**Fig. 53B**).

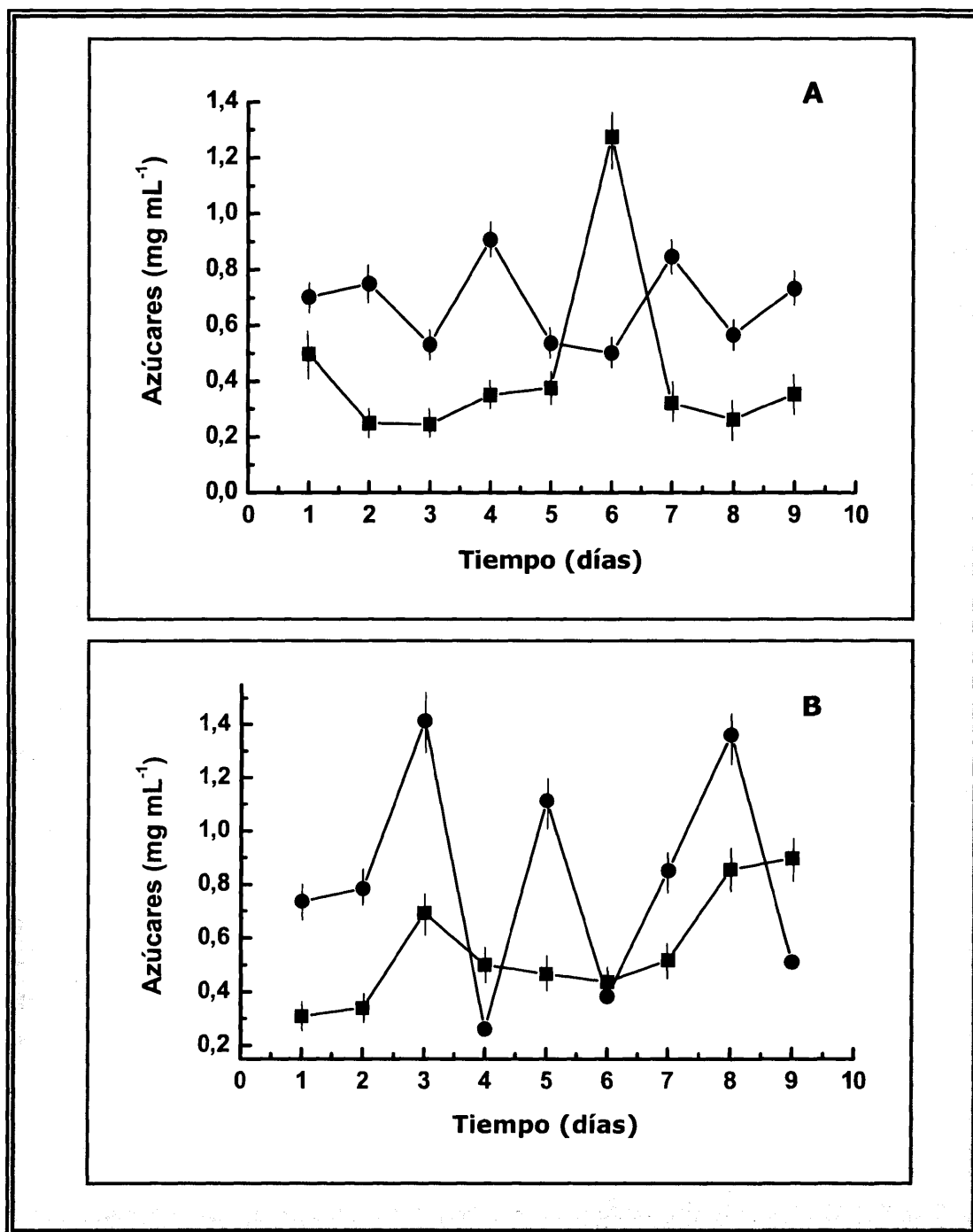


Figura 53: (A) Variación de la producción de los azúcares de las glicoproteínas HMMG (■) y MMMG (●) obtenidos a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos de caña de la variedad Barbados de 12 meses de edad sin inocular con *Xanthomonas albilineans*. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas. (B) Variación de la producción de los azúcares de las glicoproteínas HMMG (■) y MMMG (●) obtenidos a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos de caña de la variedad Barbados de 12 meses de edad inoculados con *Xanthomonas albilineans*. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

Los jugos obtenidos a partir de los segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-321, de 12 meses de edad, fueron precipitados con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% antes del fraccionamiento y posteriormente se filtraron a través del sistema de columnas G-10 y G-50 conectadas en serie. Se valoró la cantidad de azúcares totales, a cada día del experimento (desde el día 1 hasta el día 9), de las fracciones eluidas entre los 58 mL y los 70 mL, correspondiéndose con polisacáridos de peso molecular superior al de las HMMG, e igualmente se valoró la cantidad de azúcares totales de las fracciones eluidas entre los mL 71 y 101, relacionados con las HMMG tanto en los controles como en los segmentos de tallo inoculados con la bacteria *X. albilineans*. Los resultados obtenidos de cada día del experimento aparecen representados en las **Figs. 54 y 55**.

En la **Fig. 56** se representan de forma resumida los resultados obtenidos de la medida de azúcares totales tras la precipitación con alcohol *iso*-propílico durante los nueve días de tratamiento, procedentes de las fracciones eluidas entre los 71 mL y 101 mL, tanto en los controles como en los inoculados con la bacteria. Se pudo observar que la cantidad de azúcares en la fracción correspondiente a las HMMG, recuperada después de la filtración a través de el sistema de columnas G-10 y G-50 conectadas entre sí, fue siempre superior a los valores obtenidos a partir de jugos sin tratar. El tratamiento con alcohol *iso*-propílico modifica el patrón de elución de las HMMG (**Fig. 56**).

Además, se obtuvieron cantidades significativas de azúcares totales en las fracciones obtenidas antes de la elución de las HMMG (desde el mL 58 al 70), recuperadas al final del volumen muerto. La cantidad de azúcares obtenida en estas fracciones procedentes de los segmentos inoculados con la bacteria fue siempre inferior a la obtenida a partir de segmentos de caña sin inocular (**Fig. 57**). Sin embargo, la cantidad de azúcares recuperados de los tratamientos control decreció drásticamente a partir del segundo día de almacenamiento e incrementó de manera discreta a partir del quinto día de almacenamiento. Los azúcares obtenidos a partir de los segmentos de caña inoculados con la bacteria (xantanos) continuaron incrementando. Los azúcares obtenidos al final del volumen muerto podrían ser considerados como polímeros de peso molecular superior al de los polisacáridos identificados estrictamente como asociados a las HMMG y, por tanto, se trataría de xantanos producidos por la bacteria *X. albilineans* (**Fig. 57**).

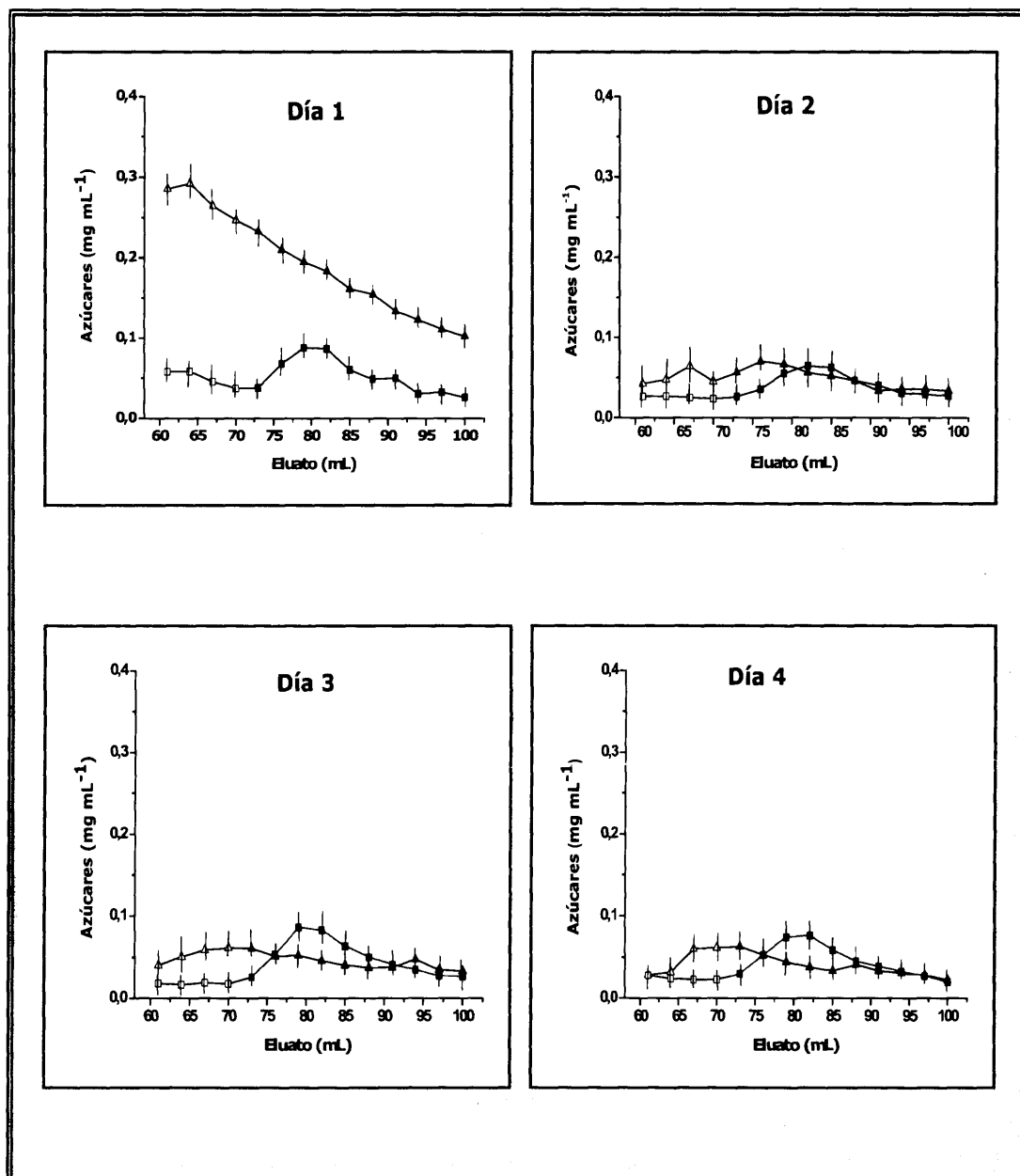


Figura 54: Variación del contenido de azúcares totales en las fracciones de polisacáridos insolubles en alcohol *iso*-propílico sin inocular (Δ), en las fracciones de glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG) sin inocular (\blacktriangle) e inoculadas (\blacksquare) y xantanos (\square) aislados a partir de segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 de 12 meses de edad, en los días 1, 2, 3 y 4 del experimento. Los valores obtenidos son la media de 3 réplicas

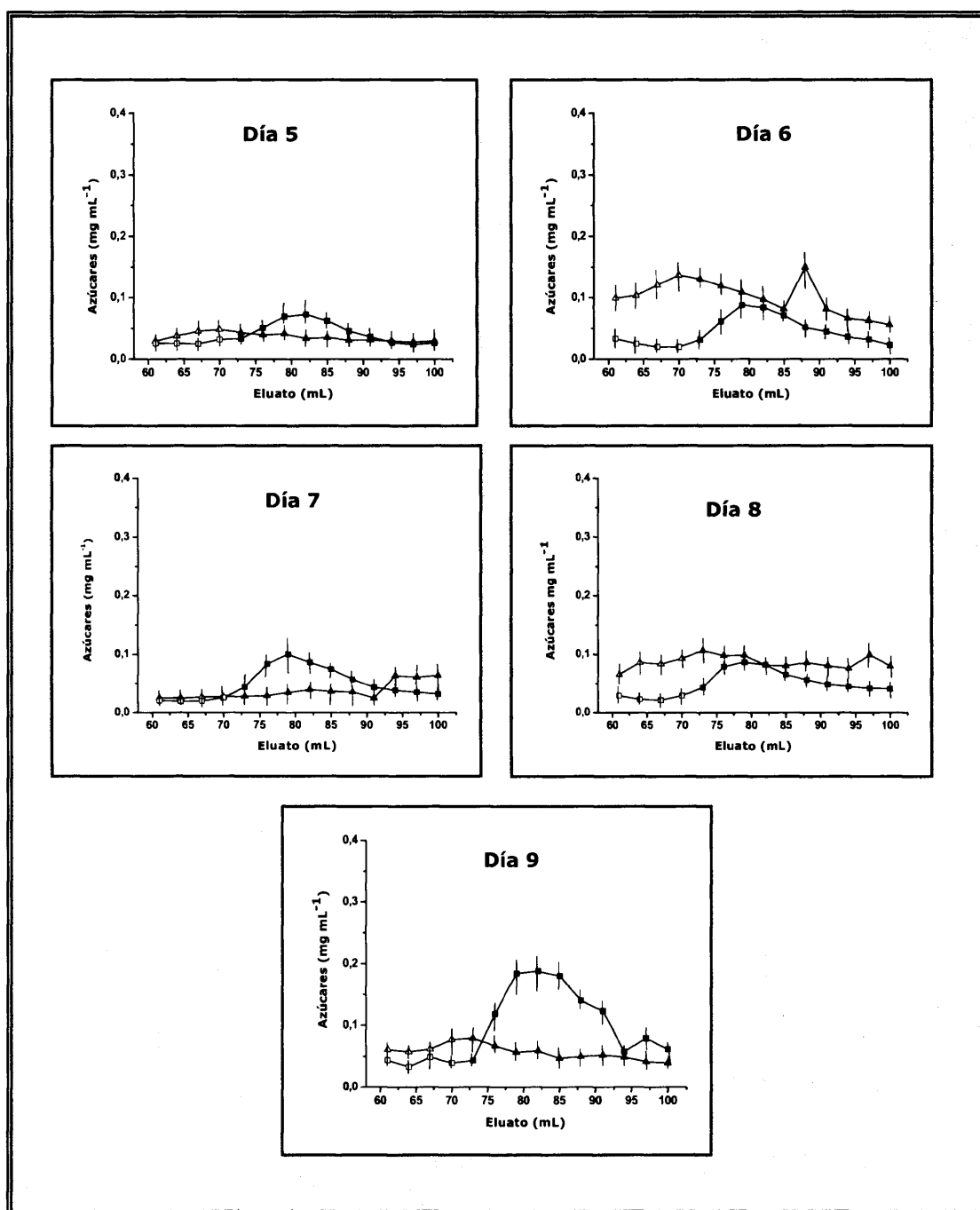


Figura 55: Variación del contenido de azúcares totales en las fracciones de polisacáridos insolubles en alcohol *iso*-propílico sin inocular (Δ), en las fracciones de glicoproteínas de alto peso molecular (HMMG) sin inocular (Δ) e inoculadas (\blacksquare) y xantanos (\square) aislados a partir de segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231 de 12 meses de edad, en los días 5, 6, 7, 8 y 9 del experimento. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

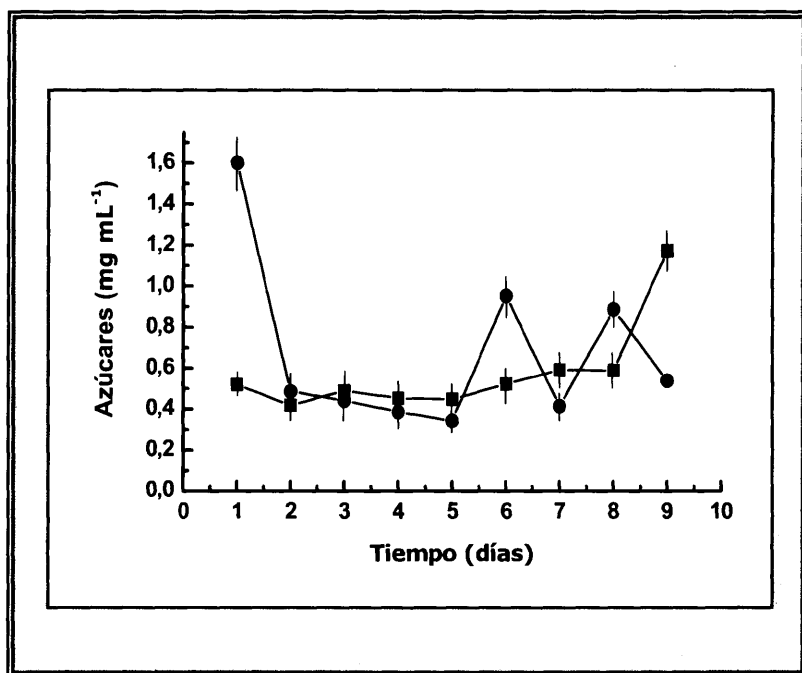


Figura 56: Variación de la producción de los azúcares de las glicoproteínas asociados a HMMG obtenidas a partir de jugo de caña de azúcar de 12 meses de edad tras ser precipitados con alcohol *iso*-propílico conteniendo 3% KCl procedentes de segmentos de caña sin inocular con la bacteria *Xanthomonas albilineans* (●) y a partir de segmentos de caña inoculados (■). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

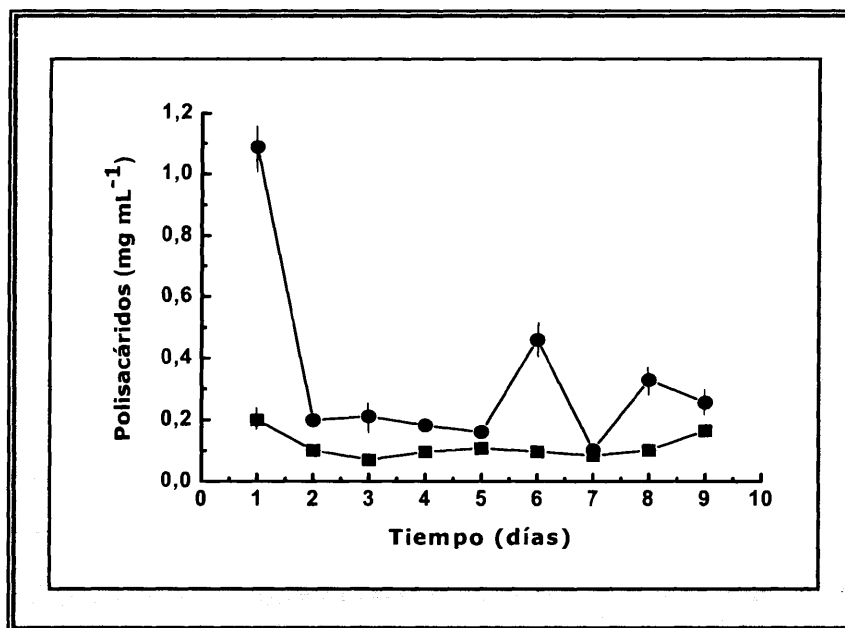


Figura 57: Variación de los polisacáridos con peso molecular superior al de las HMMG extraídos con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% a partir de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* (■) y sin inocular con dicha bacteria (●). Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

Se procedió entonces a valorar el contenido proteico de las fracciones comprendidas entre los mL 58 y 70 obtenidos tras la filtración a través del sistema de columnas G-10 y G-50 conectadas en serie y previamente sometidas a precipitación con alcohol *iso*-propílico antes del fraccionamiento. Los resultados obtenidos de la variación del contenido proteico tanto en las muestras control como en las inoculadas con la bacteria aparecen representados en la **Fig.58**. Los jugos precipitados con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3%, procedentes de segmentos de caña de la variedad Barbados no inoculados con la bacteria *X. albilineans*, revelaron cantidades significativas de proteínas en comparación con los jugos sometidos al mismo tratamiento pero inoculados con la bacteria (**Fig.58**).

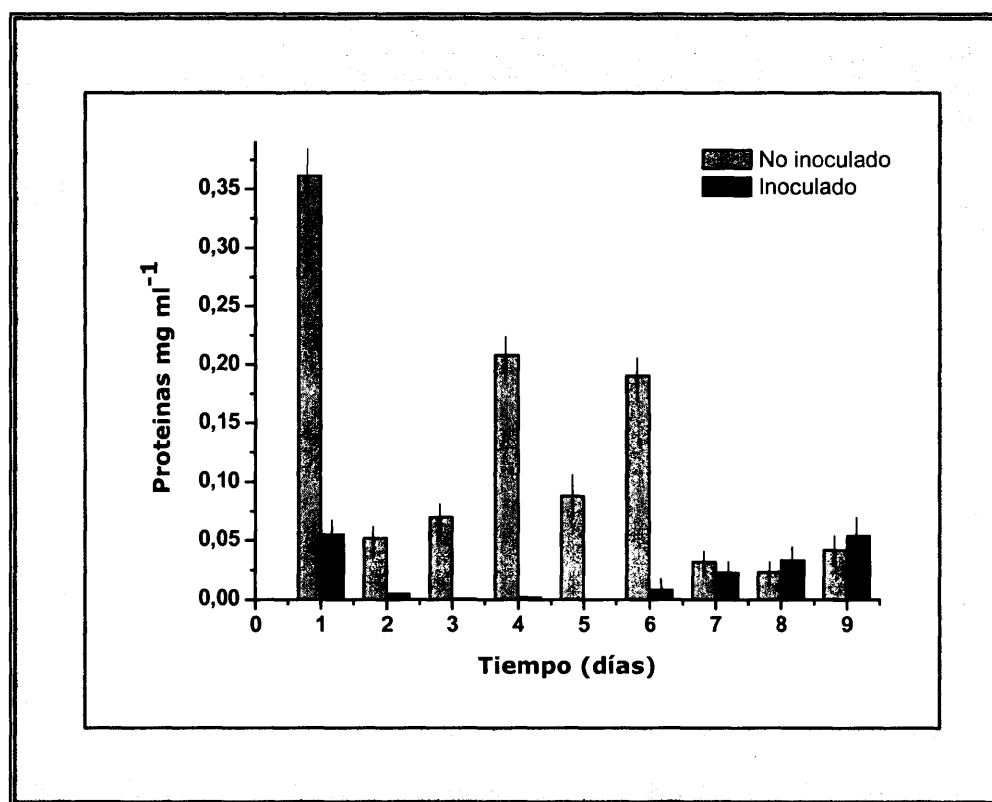


Figura 58: Variación del contenido de proteínas de las fracciones eluidas a través del sistema de columnas G-10 y G-50 conectadas entre sí de las fracciones obtenidas antes de la elución de las HMMG (desde el mL 58 al mL 70) precipitadas con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% procedentes de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos de tallos inoculados y sin inocular con *Xanthomonas albilineans*. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

Una vez valorado el contenido proteico de las fracciones comprendidas entre los 58 mL y los 70 mL se analizaron dichas fracciones mediante Electroforesis Capilar, preparando las muestras tal y como se explicó en el apartado 3.10.4 del Material y Métodos.

El análisis electroforético reveló que las macromoléculas obtenidas a partir de las fracciones procedentes de los tratamientos control se resolvieron en dos picos con tiempos de migración de 5,87 min y 8,42 min respectivamente, absorbiendo a una longitud de onda de 200 nm. Tan sólo el último pico resuelto a los 8,42 min resultó también absorber a los 280 nm. (**Fig. 59 A y B**). Igualmente, se detectaron 2 picos de polímeros que absorben a 200 nm procedentes de los segmentos inoculados con la bacteria. Dichos picos presentaron tiempos de migración de 5,87 min y 9,0 min respectivamente (**Fig. 60 A**), pero ninguno de ellos fue detectado cuando se midió absorbancia a los 280 nm (**Fig. 60 B**).

Ambas fracciones fueron hidrolizadas con HCl 6N de acuerdo con el apartado 3.10.3. de Material y Métodos, y los hidrolizados obtenidos fueron analizados mediante Electroforesis Capilar (apartado 3.10.4 de Material y Métodos). El análisis reveló que el hidrolizado obtenido de la fracción procedente de los segmentos no inoculados con la bacteria *X. albilineans* estaba compuesta de glucosa con un tiempo de migración de 9,98 min, galactitol con tiempo de migración de 7,90 min y glucosa 1-fosfato con un tiempo de migración de 15,57 min (**Fig. 61 A**).

El análisis realizado en las mismas condiciones, pero a partir de segmentos inoculados con la bacteria *X. albilineans*, se resolvió en picos compuestos por glucosa, con un tiempo de migración de 10,39 min, manosa con tiempo de migración de 10,54 min, ácido glucurónico, con tiempo de migración de 11,74 min y glucosa 1-fosfato, con tiempo de migración de 15,57 min (**Fig. 61 B**). Tanto el ácido glucurónico como la manosa son componentes constitutivos de los xantanos producidos por *X. albilineans* y *X. campestris*, por lo que esto implicaría que los polisacáridos aislados a partir de jugos de caña procedentes de segmentos inoculados con peso molecular superior al de las HMMG serían producidos por la bacteria patógena.

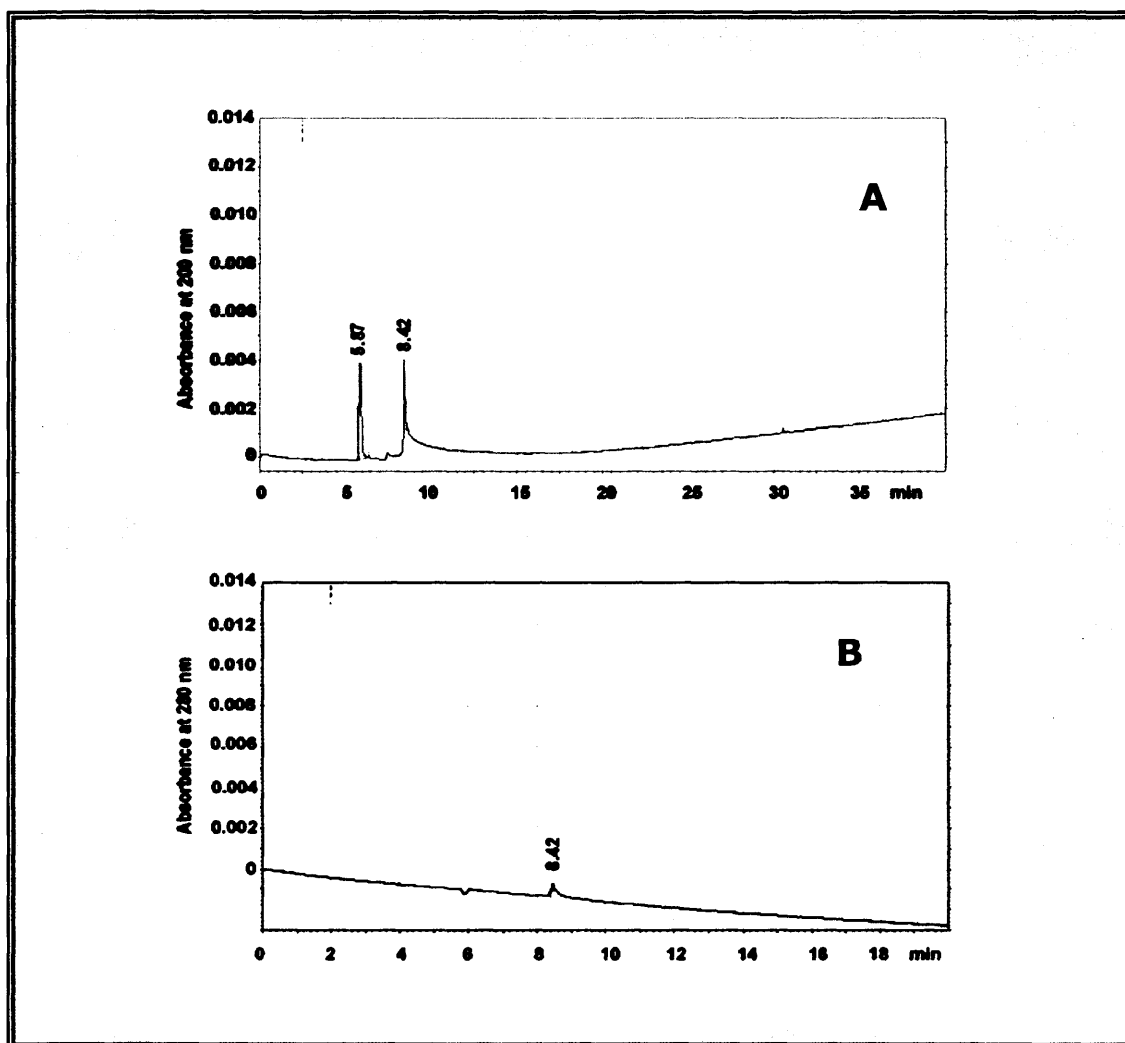


Figura 59: (A) Electroferograma de las fracciones precipitadas con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3%, obtenidas a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos no inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* después de un día de tratamiento y eluidos a través de una sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las obtenidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis reveló dos picos diferentes absorbiendo a 200 nm con tiempos de migración absolutos de 5,87 min y 8,42 min. (B) Electroferograma de las fracciones extraídas con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% procedentes de jugo de caña de azúcar de segmentos no inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* después de un día de tratamiento y eluidos a través de una sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las obtenidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis reveló un único pico absorbiendo a 280 nm con un tiempo de migración absoluto de 8,42 min.

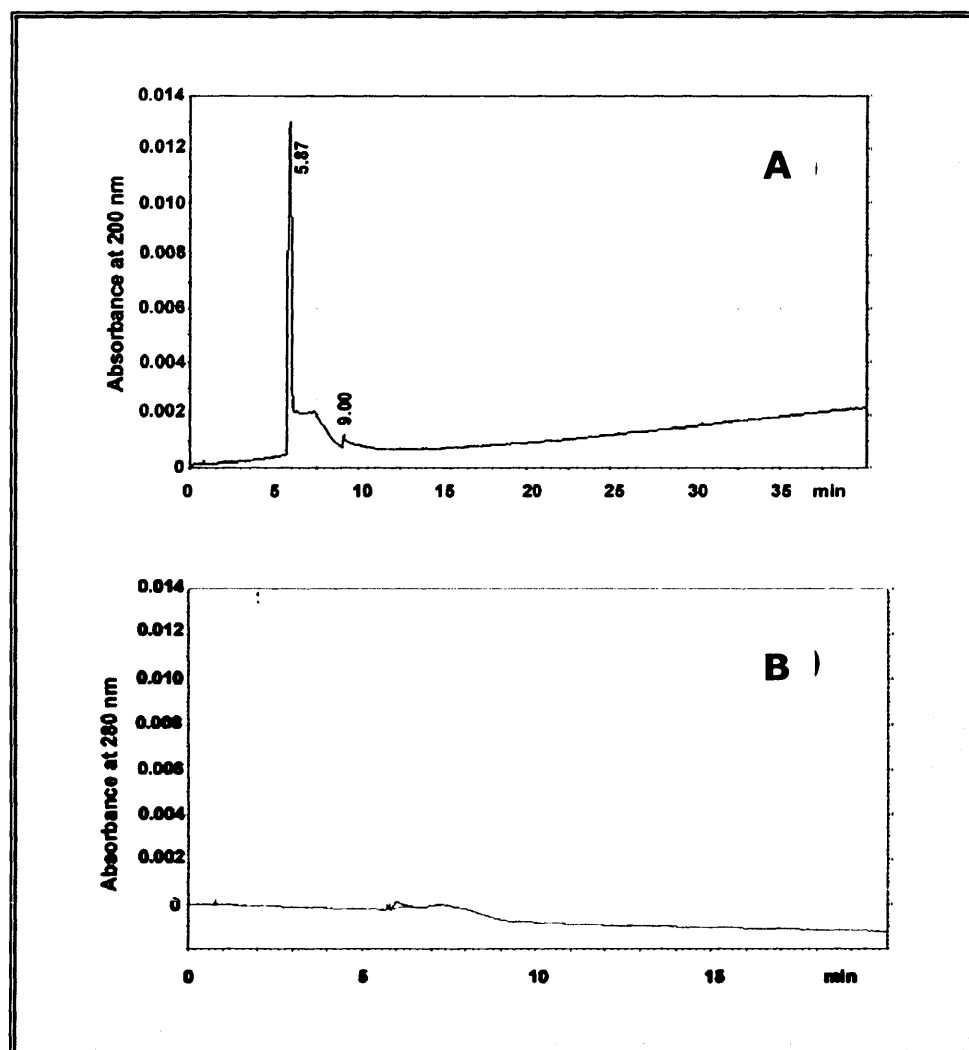


Figura 60: (A) Electroferograma de las fracciones extraídas con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* pasados un día de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las eluidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis mostró dos picos diferentes absorbiendo a 200 nm con movilidades electroforéticas absolutas de 5,91 min y 9,0 min. (B) Electroferograma de las fracciones precipitadas con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* pasado un día de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie. Las fracciones analizadas son las eluidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG. El análisis no detectó ningún pico electroforético cuando se midió absorbancia a 280 nm.

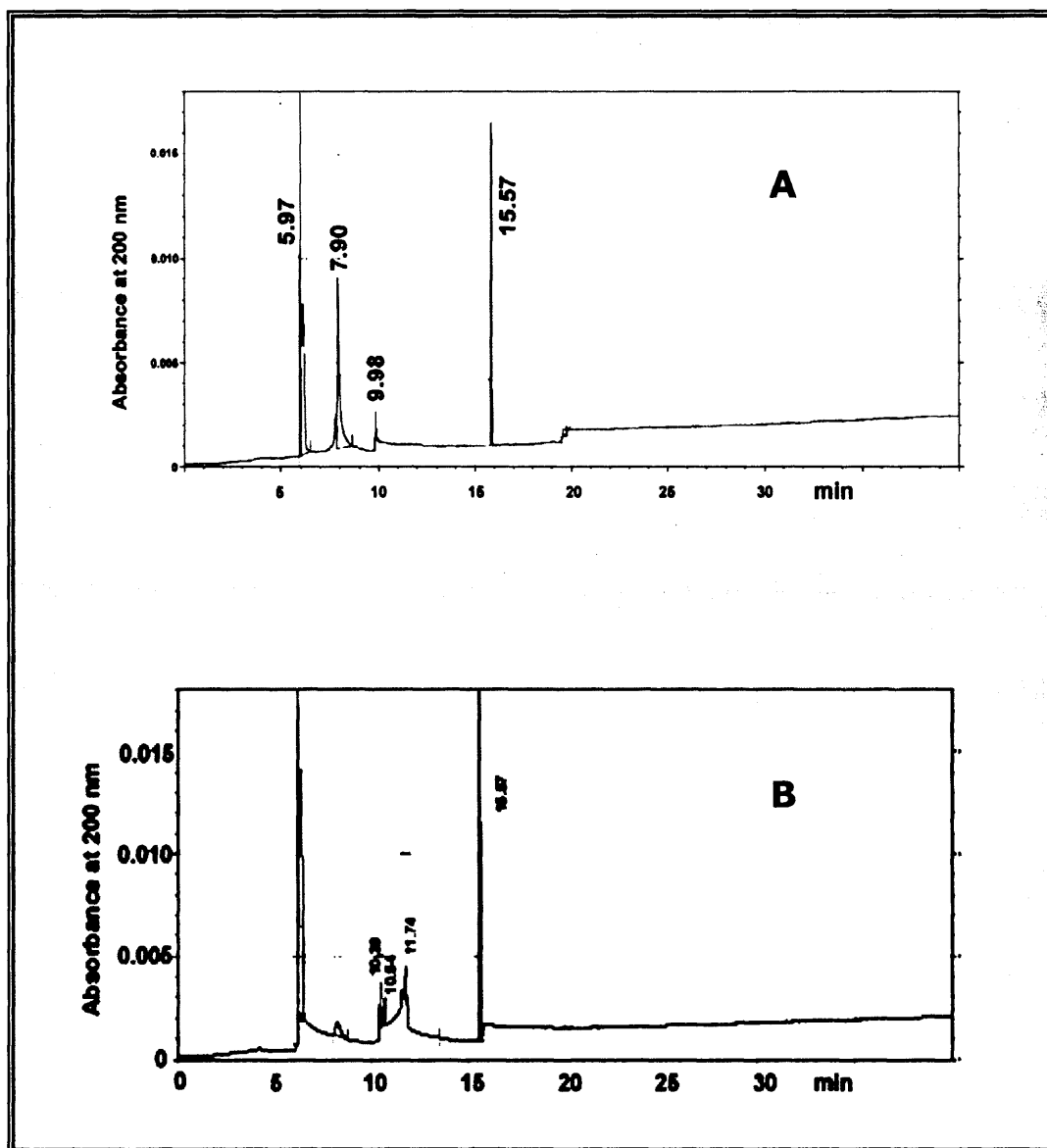


Figura 61: (A) Electroferograma de los azúcares liberados tras la hidrólisis ácida de los polisacáridos precipitados con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos de caña no inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* después de cinco días de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie eluidas entre los mL 58 al 70 previos a la elución de las HMMG.

(B) Electroferograma de los azúcares liberados tras la hidrólisis ácida de los polisacáridos precipitados con alcohol *iso*-propílico conteniendo KCl al 3% de jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de segmentos de caña inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* después de cinco días de tratamiento y eluidos a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie de las fracciones comprendidas entre los 58 mL y los 70 mL previos a la elución de las HMMG.

4.4. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE LA SACAROSA ORIGINADAS POR EL XANTANO PRODUCIDO POR *Xanthomonas albilineans*.

Bajo el punto de vista de la posible utilización de tallos de planta enferma en la industria azucarera, era interesante analizar si los xantanos en los jugos, coexistentes con polisacáridos de caña y con la propia sacarosa, podían influir en el proceso de cristalización del azúcar. En una primera aproximación, se realizó una medida de sólidos solubles de los jugos de caña de azúcar extraídos a partir de los entrenudos 1 y 2 de dos tallos inoculados con la bacteria *X. albilineans* (Tallo 1.1; Tallo 1.2; Tallo 2.1 y Tallo 2.2). Igualmente se llevó a cabo la medida de sólidos solubles a partir de los jugos de caña de azúcar obtenidos a partir de los entrenudos 1 y 2 de un tallo sin inocular con la bacteria (Control 1 y Control 2). Todas estas medidas fueron comparadas con las obtenidas a partir de concentraciones de sacarosa conocidas, tal y como se indica en la **Tabla XI** y **Fig.62**.

Como se puede observar, los valores de sólidos solubles en los tallos son iguales o inferiores a los obtenidos en los tratamientos control y todos ellos inferiores a los obtenidos a partir de concentraciones de sacarosa conocidas. Esto haría pensar la posibilidad de que el proceso de inoculación afecte en cierta medida a la cuantificación de sólidos solubles.

	Control 1	Control 2	Tallo 1.1	Tallo 1.2	Tallo 2.1	Tallo 2.2	
% sólidos solubles	6	4	2	4	4	5	
							Sacarosa 20%
% sólidos solubles	7	4	2	2	7	4	21.5

Tabla XI: Estimación del Brix (% de sólidos solubles) de jugo de caña de azúcar extraído a partir de dos segmentos de tallo de caña procedentes de los entrenudos 1 y 2 inoculados (Tallo 1.1; Tallo 1.2; Tallo 2.1 y Tallo 2.2) y sin inocular con la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Control 1 y Control 2), así como los valores obtenidos a partir de concentraciones conocidas de sacarosa.

La cristalización de la sacarosa obtenida a partir de los jugos de los tallos de plantas del cultivar Barbados (sensible a la escaldadura foliar), muestra notables diferencias en comparación con los jugos extraídos de plantas sanas (sin inocular con la bacteria). De la observación microscópica del proceso pasadas 24 h, se deduce un doble efecto:

- 1) El número de cristales de sacarosa formados disminuye drásticamente en los jugos inoculados (**Fig. 63 A y B**),
- 2) Los escasos cristales formados muestran la típica aglomeración de prismas en complejos de forma de estrellada, aunque los núcleos son amorfos, o por el contrario, los prismas individuales muestran un escaso grado de agregación (**Fig. 63 C y D**).

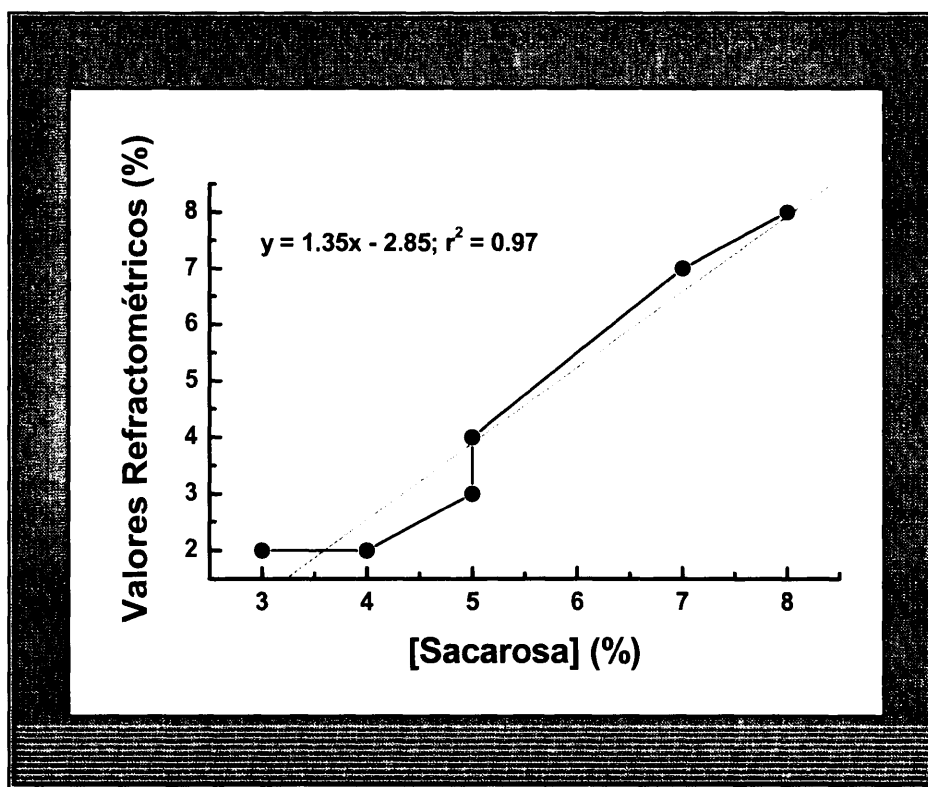


Figura 62: Estimación del Brix obtenido a partir de concentraciones conocidas de sacarosa.

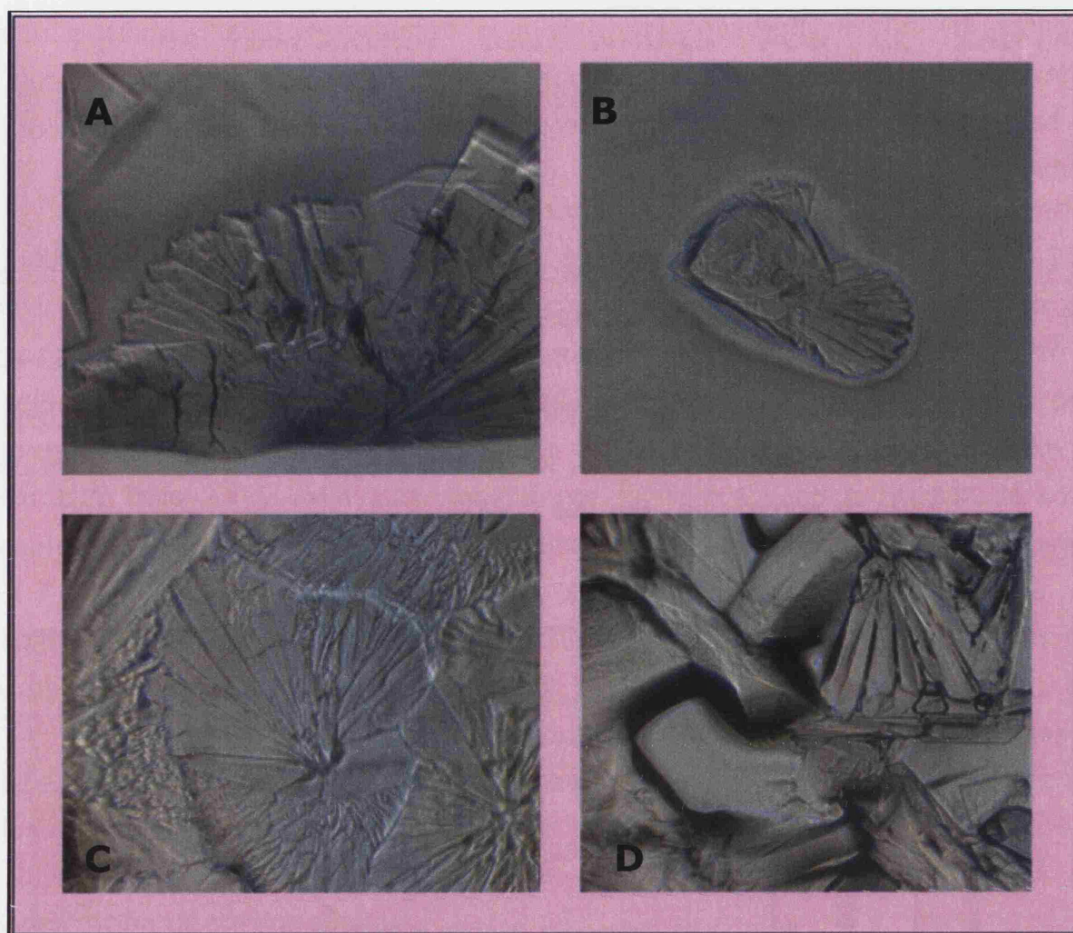


Figura 63: (A) Cristalización parcial de la sacarosa a las 6 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña no inoculados. (B) Cristalización parcial de la sacarosa a las 6 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña inoculados con *Xanthomonas albilineans*. (C) Cristalización total de la sacarosa a las 24 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña no inoculados con la bacteria. (D) Cristalización total de la sacarosa a las 24 h a partir de jugos de caña de azúcar previamente clarificados procedentes de segmentos de tallos de caña inoculados con *Xanthomonas.albilineans*.

Los xantanos fueron purificados a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de segmentos de caña inoculados con la bacteria *X. albilineans* tal y como queda explicado en el apartado 3.11.5. de Material y Métodos. Los xantanos eluyeron desde el mL 58 al 70 a través del sistema de columnas G-10 y G-50 de Sephadex conectadas entre sí. Esta elución fue previa a la de las HMMG que eluyeron entre los 71 mL al 101 mL (**Fig. 64**).

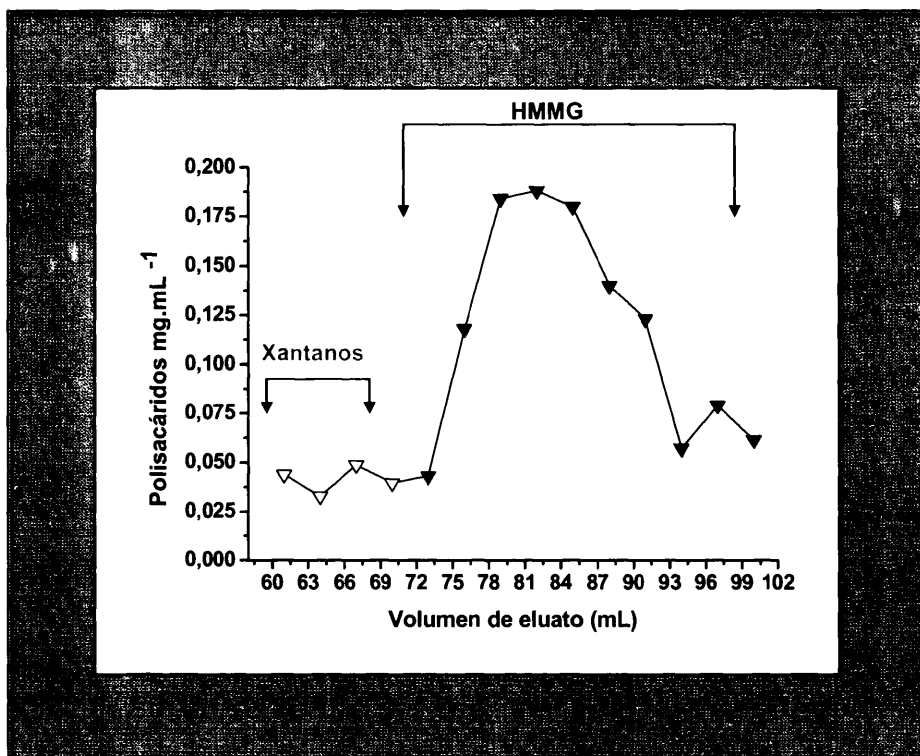


Figura 64: Perfil de elución a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 y G-50 conectadas en serie de los xantanos y las HMMG en jugos obtenidos a partir de segmentos de caña de azúcar inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans*.

Mediante la adición de xantanos producidos por la bacteria *X. albilineans* a disoluciones saturadas de sacarosa, fue posible llevar a cabo una simulación *in vitro* del efecto de los polisacáridos bacterianos en el proceso de cristalización de la sacarosa cuando ambos compuestos se mezclaron en jugos procedentes de segmentos de caña de azúcar enferma. Se produjeron notables diferencias en el patrón de cristalización de la sacarosa que pudieron ser observados cuando a determinadas disoluciones saturadas de sacarosa se adicionaron volúmenes pequeños (50 μ L) de los xantanos purificados obtenidos a partir de segmentos de caña de azúcar inoculados con la bacteria (**Fig.65**).

La adhesión de cristales individuales formando agregados estrellados fracasó en la mayoría de los ensayos (**Fig.65 A, B, E y F**) y los cristales se fracturaban durante el proceso de cristalización (**Fig. 65 C y D**). Sin embargo, en ausencia de xantanos, el proceso de cristalización de la sacarosa se llevó a cabo comenzando por la formación de cristales irregulares con forma de prisma, que fueron creciendo en sus superficies laterales (**Fig. 66A y B**).

Resultados

La vía de agregación de estos cristales es reducida, a través de pequeñas superficies que dan lugar a la formación de cristales estrellados (**Fig. 66 C**).

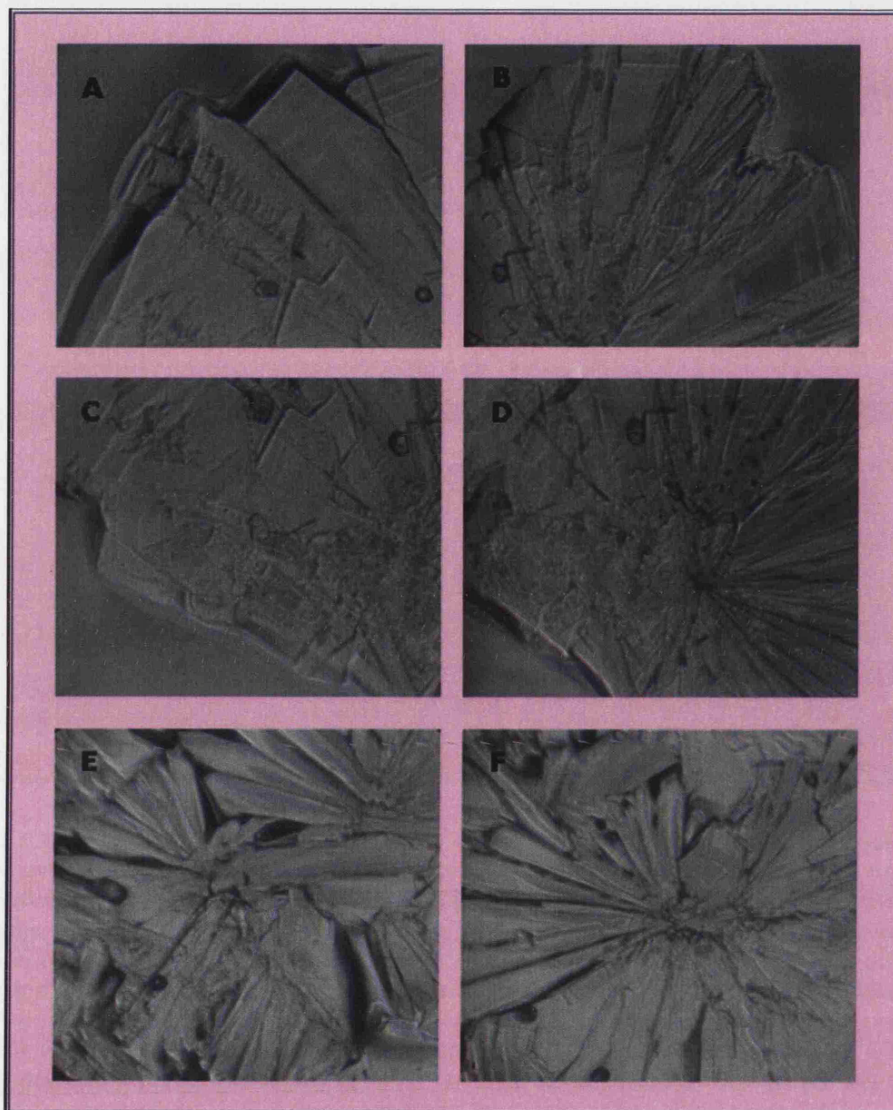


Figura 65: (A y B) Cristalización parcial de la sacarosa a las 4 h a partir de una disolución saturada de sacarosa y adición de xantano. (C y D) Cristalización parcial de la sacarosa a las 6 h a partir de una solución saturada de sacarosa con la adición de xantano. (E y F) Cristalización completa de la sacarosa a las 24 h a partir de una concentración saturada de sacarosa con la adición de xantano.

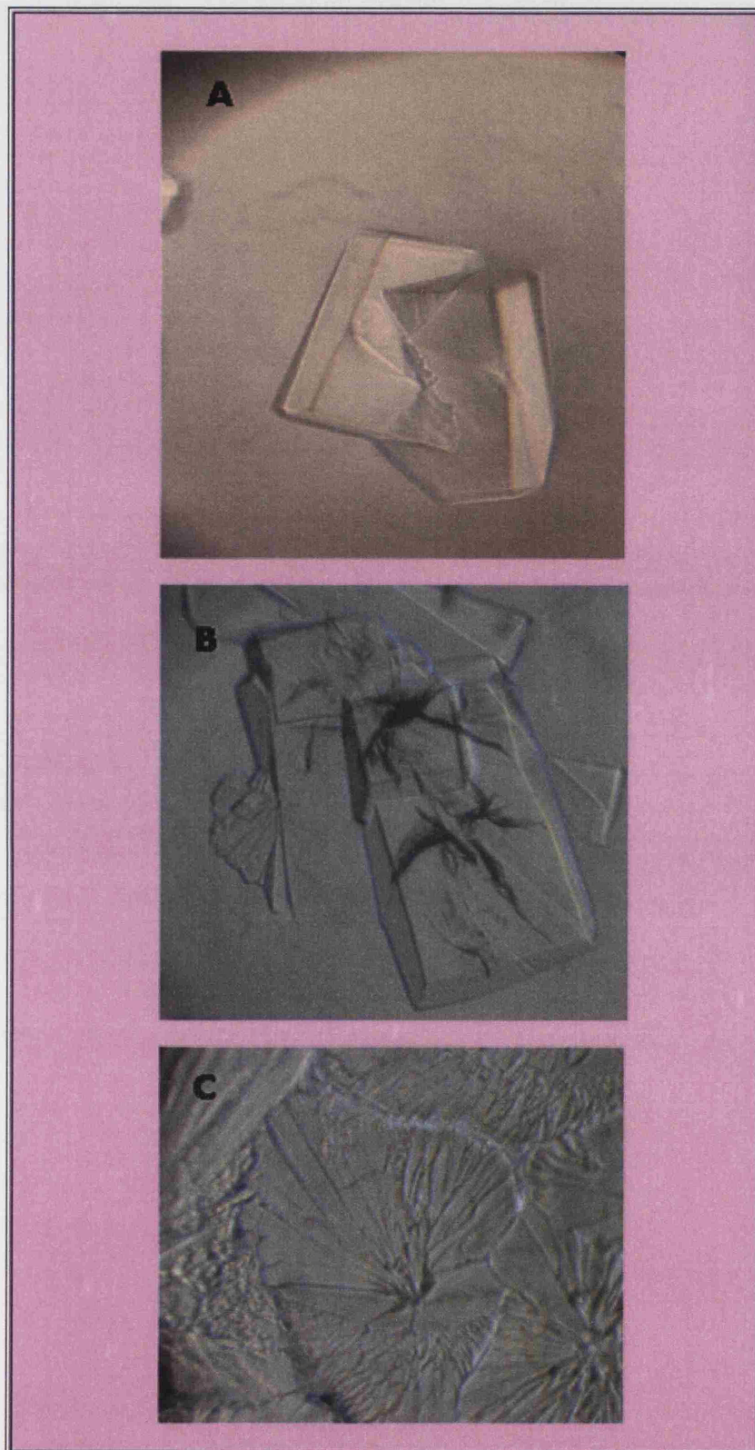


Figura 66: (A), (B) y (C) Diferentes cristales de sacarosa obtenidos a las 24 h a partir de una disolución concentrada de sacarosa sin la adición de xantano.

DISCUSIÓN

5.1. *Xanthomonas albilineans* ES UNA BACTERIA PRODUCTORA DE XANTANOS.

El xantano, un polisacárido extracelular producido por *X. campestris*, consiste esencialmente en un esqueleto principal de β -D-glucano en uniones 1 \rightarrow 4, sustituido en posición O-3 de cada segunda unidad glucosa por el trisacárido β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow Además, las cadenas laterales pueden contener una cantidad variable de restos O-acetil y piruvato, lo que conduce a una gran heterogeneidad estructural del polímero. Dependiendo de la cepa bacteriana usada para producir el polisacárido, la fracción de la cadena lateral que contiene piruvato puede variar de 0 a 100% (Tait *et al.*, 1986). Se han descrito muestras de xantano con alto contenido en restos acetilo. La proporción de restos acetilo puede exceder el valor teórico de un residuo por unidad pentasacarídica repetida. Aunque la localización de estos grupos acetilo adicionales es incierta, se ha especulado que las acetilaciones múltiples de residuos manosil internos puede ser posible en algunos xantanos, así como la acetilación de los grupos manosil terminales (Stankowski *et al.*, 1993).

Se sabe que la estructura secundaria de los xantanos surge de una transición conformacional orden-desorden, dependiendo de la extensión de la sustitución por piruvato. La mayor parte de los autores explican la estabilización de la forma ordenada por un empaquetamiento no covalente de las cadenas laterales a lo largo del esqueleto del glucano mediante puentes de hidrógeno (Morris *et al.*, 1977). La cuestión de si una molécula de xantano está organizada como una banda simple o doble en disolución acuosa está aún bajo debate. Las discrepancias encontradas en la bibliografía surgen de las diferencias en la salinidad y temperatura de dichas disoluciones durante la experimentación siguiendo diferentes tratamientos. En su forma nativa, el xantano es una doble hélice compacta (Lund *et al.*, 1990) que puede extenderse al inducirse transiciones orden-desorden cuando disminuye el grado de salinidad o incrementa la temperatura (Liu *et al.*, 1987). A la extensión sigue siempre un incremento de la viscosidad del xantano en disolución.

Los xantanos son uno de los principales factores de patogenicidad de *X. campestris*. Su producción en el interior de la planta provoca la oclusión de los elementos conductores, tanto xilema como floema, lo que termina en un proceso de desecación generalizada del huésped. De hecho, tres mutantes deficientes en el polisacárido extracelular mostraban patogenicidad reducida en su bioensayo sobre plántulas de rábano (Li *et al.*, 2001).

Por otra parte, la comparación de mutantes de *X. campestris* deficientes en UDPG-dh con la cepa salvaje demostró que la expresión de esta enzima era absolutamente requerida para mantener la patogenicidad de la cepa frente a pimiento y tomate (Chang *et al.*, 2001). También *X. albilineans* (Solas *et al.*, 2003) y *Xylella fastidiosa* (da Silva *et al.*, 2001) producen un xantano relacionado con la patogenicidad de la cepa correspondiente y dirigido hacia la producción de oclusiones en los elementos de transporte a larga distancia. La diferencia fundamental entre este exopolisacárido y el producido por *X. campestris* radica en que el nuevo xantano está formado por un tetrasacárido repetitivo ensamblado mediante la adición secuencial de glucosa-1-P, glucosa, manosa y ácido glucurónico (da Silva *et al.*, 2001).

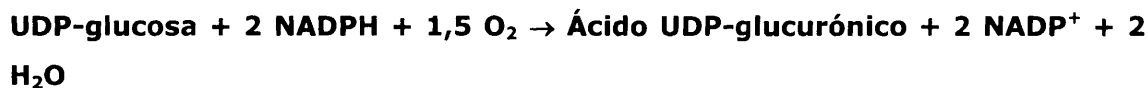
Dado que el UDP-GlcA será la unidad diferencial entre xantanos, la enzima UDPG-dh resultará entonces crucial para la adquisición de la patogenicidad y desarrollo de la enfermedad en los distintos huéspedes.

5.2. PURIFICACIÓN Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa, NADPH-DEPENDIENTE PROCEDENTE DE LA BACTERIA *X. albilineans*.

X. albilineans en cultivo líquido es capaz de producir una enzima que cataliza una reacción redox que usa UDPG como substrato y NADPH como cofactor. No obstante, la ausencia de reacción redox usando NAD^+ o NADP^+ en lugar de NADPH implica que esta enzima no cataliza la reacción convencional descrita para otras UDPG-deshidrogenasas (EC 1.1.1.22):



como ha sido descrito para la enzima estudiada en plantas, animales y bacterias (Ankel *et al.*, 1966; Jaenicke y Rudolph, 1986; Sieberth *et al.*, 1995; Stewart y Copely, 1999), sino la reacción alternativa



como se deduce de la dependencia de oxígeno para la oxidación de NADPH (**Figs. 34 A y 44C**).

La cantidad de producto formado es linealmente dependiente de la cantidad de oxígeno aportado a la mezcla durante el transcurso de la reacción (**Fig. 44 C**), lo cual indica una clara estequiometría, tal y como se expresa en la ecuación de la transformación oxidativa de UDPG. Para estudiar la producción de esta enzima, la bacteria *X. albilineans* fue cultivada en medio Wilbrink líquido (Dye, 1980) conteniendo sacarosa como única fuente de carbono. La producción óptima de la enzima UDPG-dh se obtiene a las 21-24 h de cultivo; pasado este tiempo la producción decrece. La adición de glucosa a medios Willbrink que contienen sacarosa, o el uso de glucosa como única fuente de carbono disminuye o minimiza, respectivamente, la producción de la enzima (**Fig.34 B**).

Esta conducta difiere de la observada para otros microorganismos, como *X. campestris* (Woiciechowski *et al.*, 2004), *E. coli* (Grangeasse *et al.*, 2003) o *Streptococcus termophilus* (Levander y Radström, 2001), en las que tanto el crecimiento bacteriano como la producción de UDPG-dh son convenientemente promovidos por glucosa.

Una acción negativa de la glucosa sobre la producción de la enzima por *X. albilineans* a través de un proceso de represión catabólica, en la forma definida por Gancedo (1992), debe ser descartada, ya que el AMPc incluido en los medios de cultivo no revierte la acción de la glucosa. (**Fig. 35**).

La enzima UDPG-dh parece ser sensible a la acción de las proteasas. Se trata de hidrolasas que son sintetizadas por la bacteria de forma paralela a la síntesis de UDPG-dh. De hecho, es absolutamente necesario incluir un cocktail de inhibidores de proteasas en las mezclas de reacción para que la actividad enzimática pueda ser convenientemente detectada. Desde el momento en que se ha descrito una UDPG-dh con características absolutamente diferentes a las otras UDPG-deshidrogenasas presentes en otros organismos, puede pensarse que estas características tan especiales deben estar relacionadas con las capacidades fisiológicas tan particulares que posee la bacteria *X. albilineans*. De hecho, la inhibición de las proteasas bacterianas mediante la acción de las glicoproteínas sintetizadas por la caña de azúcar tras la infección con la bacteria (explicado más adelante), podría ser la base de esta diferencia funcional.

La enzima ha sido purificada a homogeneidad, produciendo un único pico en Electroforesis Capilar con un tiempo de migración de 32,44 min (**Fig. 37 A**). El benceno, utilizado como marcador neutro, tiene un tiempo de migración de 9,82 min. Por ello, UDPG-dh se comporta como una proteína aniónica en nuestras condiciones de análisis, lo cual está de acuerdo con el valor de pI obtenido (8,98).

Esto implica que el pH del electrolito es ligeramente superior al pI de la proteína (**Fig. 37 B**) y, por ello, la proteína debe disociar protones y conducirse como un polianión, según la ecuación:



El peso molecular de la enzima, representado en la **Fig. 37 C**, ha sido estimado en 14,1 KDa, notablemente bajo en comparación con los obtenidos para otras UDPG-deshidrogenasas, como la enzima dimérica de *E. coli* con M_r de 72 kDa, descrito por Sieberth *et al.* (1995) o el de la proteína monomérica de *Streptococcus pyogenes* con un M_r de 45,5 KDa, descrito por Campbell *et al.* (1997). Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, para verificar que la proteína obtenida es una auténtica UDPG-dh ha sido necesario la identificación de UDP-GlcA como único producto de reacción. La detección del producto de reacción se ha llevado a cabo utilizando la técnica de Electroforesis Capilar.

En un principio se intentó separar UDP-GlcA por Electroforesis Capilar con detección indirecta y reversión de polaridad, pero la separación de los patrones utilizados, UDPG (como sustrato) y UDP-GlcA (como producto), no produjo resultados positivos (**Figs. 38, 39, 40**) y no se logró una verdadera separación de los picos detectados. Por ello se procedió a analizar nuevamente las muestras mediante Cromatografía Micelar Electrocinética con la adición de SDS como agente surfactante para disminuir el flujo electro-osmótico y atrapar moléculas del analito en las micelas correspondientes. En este caso se obtuvieron resultados algo más aclaratorios en lo que se refiere a la posible separación de los patrones UDPG y UDP-GlcA (**Fig. 41 A, B y C**), pero la separación no procedió aún con suficiente eficacia. La formación de micelas por parte del agente surfactante podría facilitar la separación de UDPG y UDP-GlcA, retrasando la salida, en este caso, de UDP-GlcA y obteniéndose un pico con tiempo de migración de 12,30 min (**Fig. 41 C**). Sin embargo, cuando se analizaron los controles (mezclas sin UDPG) y las mezclas de reacción (conteniendo sustrato, enzima y cofactor), aunque se obtuvieron electroferogramas diferentes (**Fig. 42 A y B**), los picos detectados en este último caso (**Fig. 42 B**), no resultaron ser lo suficientemente aclaratorios para poder identificar el producto de la reacción (UDP-GlcA), ya que los tiempos de migración observados difieren en gran medida de los obtenidos cuando se analizaron los patrones (**Fig. 41 A, B y C**).

La separación definitiva de UDP-GlcA se obtuvo cuando se procedió a la separación electroforética conveccional con polaridad ánodo-cátodo. En este caso se obtuvo un pico con tiempo de migración de 6,27 min, mientras que parte de UDPG

que no fue transformada en la reacción catalizada por la enzima UDPG-dh se reveló como un único pico con un tiempo de migración de 4,88 min (**Fig. 43**). Estos resultados han sido determinantes para considerar a la enzima como una verdadera UDPG-dh.

Las características cinéticas de la enzima difieren de las descritas para UDPG-dh de otras fuentes. El valor de K_m para la UDPG, 0.87 mM, es más bajo que el descrito para la enzima *E. coli* (Sieberth *et al.*, 1995; Schiller *et al.*, 1973) pero más alto que el descrito para UDPG-dh del grupo A de estreptococos (Campbell *et al.*, 1997) o la enzima de nódulos de soja (Stewart y Copeland, 1999). No obstante, el valor de K_m de la enzima de *Xanthomonas* para NADPH (0.30 mM) fue siempre superior al encontrado para el NAD^+ usado por las otras UDPG-deshidrogenasas (**Figs. 44 y 45 A y B**). La enzima UDPG-dh se comporta como una enzima alostérica para el NADPH (**Fig. 45 C**). Un valor de coeficiente de interacción de 3,0 indica que la enzima posee tres centros de unión diferentes para el NADPH, de los cuales tan solo uno sería el centro catalítico para UDPG y los dos restantes de regulación alostérica. El hecho de que la enzima UDPG-dh muestre un único centro catalítico para UDPG (**Fig. 45 A**) y asumiendo que la unión de las moléculas del NADPH a los centros de regulación modifican las constantes cinéticas de la enzima (**Fig. 45 C**), la enzima UDPG-dh de *X. albilineans* podría definirse como una enzima mixta, alostérica para su coenzima, de acuerdo con Klotz y Hunston (1975).

Esto podría explicar la respuesta sigmoidal de la enzima a concentraciones crecientes de efector, así como la inhibición de la enzima para concentraciones de NADPH superiores a 0,22 mM. Sin embargo, considerando el NAD^+ del que dependen UDPG-deshidrogenasas procedentes de otras fuentes, éstas muestran siempre una relación micaeliana frente a su cofactor NAD^+ (Hinterberg *et al.*, 2002; Sommer *et al.*, 2004). Estas diferencias confirman la singularidad de esta enzima de *X. albilineans*, tan diferente a las otras UDPG-deshidrogenasas.

Para determinar el pH y temperatura óptima de UDPG-dh se hicieron ensayos de actividad enzimática para un rango de valores de pH y de temperatura tal y como queda explicado en el apartado 3.6.3. de Material y Métodos. Los resultados obtenidos representados en la **Fig 46 (A y B)** vuelven a dejar patente la peculiaridad de esta enzima en comparación con otras UDPG-deshidrogenasas de otras fuentes.

En el caso de *Cryptococcus laurentii* (Ankel, *et al.*, 1966), la enzima desarrolla su máxima actividad en un rango de pH comprendido entre 6,3 y 8,6 presentando un pH óptimo de 7,3. Sin embargo UDPG-dh de *Lilium longiflorum* presenta un pH óptimo de 8,4 (Davies y Dickinson, 1972).

En estudios realizados en *E. coli* (Schiller, *et al.*, 1973), se ha podido comprobar que en este caso la enzima presenta sus mayores valores de actividad enzimática trabajando a pH 9,0 y a una temperatura de 30°C.

El extremo N-terminal de UDPG-dh, dependiente de NADPH, purificada representa otra drástica diferencia frente a las UDPG-deshidrogenasas convencionales dependientes de NAD⁺. Mientras que la metionina es el aminoácido N-terminal de estas deshidrogenasas, tales como la bovina (Lind *et al.*, 1999), de *E. coli* (Welch *et al.*, 2002), de *Sinorhizobium meliloti* (Capela *et al.*, 2001), o de soja (Tenhaken y Thulke, 1996), demostramos que la isoleucina es el aminoácido N-terminal de la UDPG-dh de *X. albilineans* (**Tabla X**). Esta diferencia constituye una prueba más de la singularidad de esta deshidrogenasa, aunque muchas otras proteínas contienen el mismo aminoácido como primero de la secuencia N-terminal, como sucede en la somatolactina (Zhu *et al.*, 1999).

5.3. PAPEL DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE CAÑA DE AZÚCAR Y EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA UDPG-deshidrogenasa.

Del estudio realizado para averiguar el posible papel que juegan las glicoproteínas de la caña de azúcar y el efecto de los inhibidores de proteasas en la producción de la enzima UDPG-dh, se han obtenido conclusiones relevantes. Como se ha dicho anteriormente, algunas de las glicoproteínas producidas por la caña de azúcar muestran capacidad de unión a otras glicoproteínas en la superficie de patógenos potenciales y de endosimbiontes. En este sentido, podría decirse que ambas HMMG y MMMG actúan de manera semejante a lectinas, ya que el enlace β -1,2-fructosil fructosa puede ser reconocido específicamente por dominios aminoacídicos particulares de glicoproteínas de paredes celulares de *G. diazotrophicus* (Legaz *et al.*, 2000), quedando entonces ligadas mediante un mecanismo de afinidad a la superficie externa de dichas paredes celulares y pudiendo ser separadas de ellas por competición con un exceso de sacarosa. Esta sería la función tipo de las lectinas vegetales, en la que la interacción proteína-proteína es determinante de los sistemas de información sobre compatibilidad o incompatibilidad celulares (Rao *et al.*, 1998). En otros casos, es la mitad peptídica de HMMG y MMMG la que posee dominios específicos de reconocimiento de N-acetil-D-glucosamina, uniéndose entonces a glicoproteínas que contienen el amino azúcar, constitutivas de paredes celulares de teliosporas de *Ustilago scitaminea* (Millanes *et al.*, 2005) o de células bacterianas de *X. albilineans* (Blanco *et al.*, 2005 b). En este sentido, a las glicoproteínas de caña les corresponderían otros ligandos (receptores)

de sistemas de señalización diferentes al reconocimiento y, por ello, se les ha adjudicado el papel de mecanismos de defensa.

Tanto sean consideradas HMMG y MMMG como glicoproteínas semejantes a las lectinas o ligandos de otras señales glicoproteicas, es interesante saber que muchas lectinas y sus receptores desarrollan en paralelo ciertas actividades enzimáticas. Shannon y Hankins (1981), por ejemplo, describieron algunas galactosidasas y manosidasas con actividad fitohemaglutinina. Molina *et al.* (1993) describieron por primera vez una proteína envuelta en el reconocimiento de algas líquénicas que desarrolla una actividad arginasa. Además, varias lectinas de plantas pueden actuar como elicitores en la producción de fitoalexinas, como ha sido demostrado en *Pisum sativum* (Toyoda *et al.*, 1995).

Algunas de ellas son también capaces de unirse a otras enzimas para modificar su actividad: la invertasa de *Ricinus communis* es activada por varias lectinas (Vattuone *et al.*, 1991) mientras que la ureasa de *Xanthoria parietina* es inhibida tras su interacción con la lectina del propio líquen (Molina *et al.*, 1993). En otros casos, las lectinas han sido ensayadas *in vitro* como inhibidores de la síntesis de proteínas (Kumar *et al.*, 1993). La unión de la lectina a su ligando no sólo modifica la actividad enzimática de su receptor específico, sino también la suya propia, si la tuviere, como sucede con la Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Fontaniella *et al.*, 2004) o la arginasa de *Evernia prunastri* (Legaz *et al.*, 2004). Por tanto, si las glicoproteínas de caña de azúcar tienen capacidad para unirse a otras glicoproteínas, bien sean de las cubiertas celulares, bien sean citoplásmicas, cabría preguntarse si dichas glicoproteínas son capaces de alterar la producción de UDPG-dh bacteriana, bien desencadenando una cascada de señales desde su unión a receptores de pared, bien interaccionando con proteínas reguladoras de la síntesis de la enzima, bien uniéndose a la propia enzima.

Como se muestra en la **Fig.48** puede afirmarse que las glicoproteínas sintetizadas por la caña de azúcar no compiten con la 8-azaguanina activando la transcripción del mRNA correspondiente a UDPG-dh. La presencia de HMMG ó de MMMG junto con el cloranfenicol en los medios de cultivo produce una disminución de los valores de actividad enzimática en comparación con los obtenidos en los cultivos control suplementados únicamente con cloranfenicol. Podría plantearse la posibilidad de que existiera una cierta competencia entre las glicoproteínas de la caña y el cloranfenicol inhibidor del proceso de traducción (**Fig. 49**). Tanto el cloranfenicol como la 8-azaguanina anulan la pérdida de la actividad enzimática de UDPG-dh en ausencia de las glicoproteínas de caña de azúcar (**Fig.50**).

Los resultados obtenidos podrían explicar que con concentraciones de 100 µM de 8-azaguanina o cloranfenicol se inhiba principalmente la síntesis de las proteasas

bacterianas, responsables de la pérdida de actividad UDPG-dh con el tiempo, mientras que los mismos antimetabolitos, a una concentración de 300 μ M, podrían inhibir la síntesis tanto de las proteasas bacterianas como de la enzima UDPG-dh. Una explicación similar podría invocarse para justificar el efecto de las HMMG y MMMG. El papel inhibitorio que juegan las MMMG frente a las proteasas bacterianas es más evidente que el de las HMMG cuando dichas glicoproteínas se adicionan al medio Wilbrink líquido. Por ello, tal y como se muestra en la **Fig. 47 A**, la actividad enzimática obtenida en presencia de las MMMG es superior a la obtenida con las HMMG.

La cantidad de proteína recuperada por mg de peso seco de bacteria en cultivos suplementados con HMMG ó MMMG fue siempre superior a la obtenida en los cultivos control inoculados únicamente con la bacteria (**Fig 47B**). Dentro de estas proteínas totales, también se debe incluir a la enzima UDPG-dh. Con las HMMG o las MMMG adicionadas al medio de cultivo, se intuye un proceso de inhibición de las proteasas bacterianas permitiendo así una mayor recuperación de las proteínas totales, entre ellas UDPG-dh.

Sin embargo, la cantidad de proteína recuperada en los cultivos control fue significativamente inferior a la obtenida de cultivos sobre glicoproteínas debido a que la ausencia de éstas en el medio de cultivo favorecería la activación de las proteasas bacterianas y, como consecuencia, la degradación de UDPG-dh, como aparece representado en la **Fig. 47 B**.

X. fastidiosa, otra bacteria fitopatógena de la que ya se ha hablado ampliamente en la introducción de este trabajo, también es capaz de sintetizar proteasas extracelulares en medios de cultivo (Da Silva *et al.*, 2001). Estas proteasas producidas por cepas de *X. fastidiosa* patógenas de cultivos de cítricos y uva, pertenecen al grupo de la serín- y metaloproteasas, respectivamente (Fedato *et al.*, 2006). Dow *et al.* (1990) plantearon la posibilidad de que estas proteasas bacterianas fueran utilizadas por la bacteria para degradar proteínas de la pared celular de la planta, burlando sus sistemas de defensa y favoreciendo la diseminación de la bacteria en el interior de aquella. El papel de las proteasas en la patogenicidad depende en gran medida del sistema patógeno-hospedador (Fry *et al.*, 1994), en el cual las proteasas actúan sobre el lugar de anclaje de los péptidos e intervienen en numerosas funciones fisiológicas (Romero *et al.*, 2001). No obstante, en ausencia de organismo hospedador, estas proteasas bacterianas podrían ser utilizadas para hidrolizar proteínas bacterianas como la propia enzima UDPG-dh, tal y como ocurre en este caso.

Cuando extractos libres de células de *X. albilineans*, con actividad proteásica, fueron preincubados durante 5 min con las glicoproteínas HMMG y MMMG obtenidas

a partir de plantas de caña de azúcar, se obtuvieron resultados variables de inhibición de la actividad proteasa estimada frente a caseína, utilizada como sustrato de reacción. Tal y como se observa en la **Fig. 52**, las HMMG fueron las que presentaron valores más altos de inhibición de la proteasa bacteriana. Las características de la producción del xantano podrían entonces explicarse en base a esta acción inhibitoria, confirmada en la **Fig. 52**, de las proteasas bacterianas por las glicoproteínas de caña de azúcar. Al no ser hidrolizada, UDPG-dh activa podría asegurar la producción del xantano.

Estudios previos llevados a cabo por Legaz *et al.* (1995) explican que la cadena de las HMMG es más larga que la de las MMMG favoreciéndose por ello, en el caso de las HMMG, la unión a la estructura de las proteasas (presentando mayor número de sitios de unión) en comparación con las MMMG.

Una vez descubierto el papel que juegan las glicoproteínas de caña de azúcar en el proceso de inhibición de las proteasas bacterianas en *X. albilineans* permitiendo la producción de UDPG-dh, se podría destacar la interdependencia existente entre el patógeno y la planta, probablemente derivado de un proceso coevolutivo. A su vez, se podría también dar explicación a que la bacteria *X. albilineans* no sea capaz de producir xantano en cultivo mientras que dicho exo-polisacárido es segregado por la bacteria en condiciones naturales invadiendo los tejidos de la planta de caña de azúcar (Blanco *et al.*, 2005 b). Cuando se adicionó piperina (inhibidor específico de UDPG-dh NAD⁺ -dependiente) a los medios de cultivo, se obtuvieron resultados diferentes a los esperados, puesto que la producción de la enzima activa se mantuvo inalterada (**Fig.51**).

El uso de inhibidores específicos para el control de las proteasas bacterianas en la interacción planta-patógeno ha sido propuesto frente a las plagas de herbívoros (Ryan, 1990), hongos patógenos (Lorito *et al.*, 1994) y nematodos parásitos (Atkinson *et al.*, 1995). En el caso presente, sin embargo, la enzima UDPG-dh muestra un comportamiento especial muy diferente al de otras UDPG-deshidrogenasas procedentes de otras fuentes, pero similar al de otras enzimas como NADPH-citocromo reductasa. Esta enzima forma parte del sistema MFOS (Mixed Function Oxygenase System), involucrado en la hidroxilación de esteroides endógenos así como en el metabolismo primario de compuestos extraños. Su actividad enzimática se ve aumentada en presencia de piperina (Sambaiah y Srinivasan, 1989).

Resumiendo los resultados obtenidos hasta el momento, podría decirse que se produce una síntesis masiva de proteasas bacterianas durante las primeras horas de cultivo, proteasas que actúan de forma preferente sobre UDPG-dh neosintetizada.

Es necesaria la inhibición de la producción de estas proteasas, o de su actividad, para que la actividad UDPG-dh sea convenientemente detectable. Por ello, la susceptibilidad de la planta a la infección parece depender de la capacidad de la misma para producir los inhibidores de la proteasas bacterianas, ya que sin UDPG-dh activa, la bacteria no podría llevar a cabo la producción del xantano y la obturación de los vasos conductores del huésped, sin lo cual no se llegaría a la fase de desecación, último síntoma de la enfermedad.

La inhibición de estas proteasas esta mediada por glicoproteínas de la caña de azúcar, glicoproteínas que se sintetizan después de que las plantas de caña de azúcar sufran daño mecánico o la invasión de un patógeno, como es el caso de *X. albilineans*.

Se cree que en este hecho radica la explicación de que la bacteria no produzca xantanos en cultivo mientras que sí los produce activamente cuando parasita plantas de caña.

5.4. ESTUDIO DEL XANTANO PRODUCIDO POR *X. albilineans* OBTENIDO TRAS LA INFECCIÓN DE TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR.

Como ya se ha mencionado en el apartado 5.1 de la Discusión, bacterias fitopatógenas como *X. campestris* o *X. fastidiosa* son capaces de sintetizar un exopolisacárido denominado xantano, el cual juega un papel crucial durante el proceso de infección sobre la planta y en el desarrollo de la enfermedad, dando lugar, principalmente, a la aparición de síntomas de desecación foliar (Li *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2001). La bacteria *X. albilineans* también produce un xantano el cual, está estrechamente vinculado con la patogenicidad de la bacteria sobre la planta de caña de azúcar (Solas *et al.*, 2003; Fontaniella *et al.*, 2002 b). Como ya se ha mencionado en el apartado 5.3 de la Discusión, la bacteria es capaz de producir proteasas capaces de hidrolizar a la enzima UDPG-dh, enzima responsable en la producción de UDP-GlcA (monómero estructural de la molécula de xantano producido por *X.albilineans*) (Blanch *et al.*, aceptado). Por tanto, parece condición necesaria para la producción del xantano y su secreción que las proteasas sean inhibidas, bien por factores endógenos de la propia bacteria, lo cual parece no suceder en cultivo, bien por factores exógenos, ambientales o procedentes de la planta huésped.

Sin embargo, determinadas glicoproteínas producidas por la caña de azúcar después del proceso de infección, son capaces de actuar como potentes inhibidores frente a las proteasas bacterianas. Esto podría ser la razón de la dificultad que

conlleva el producir xantano en cultivo cuando no están presentes estos inhibidores de proteasas producidos por la caña de azúcar. Asegurada la producción de xantanos por inhibición de las proteasas bacterianas, la goma se acumula de forma primaria en los tejidos conductores, invadiendo posteriormente los tejidos parenquimatosos. De acuerdo con este razonamiento, se ha demostrado que segmentos de caña de azúcar de la variedad Barbados 42-231, altamente susceptible a la enfermedad de la escaldadura foliar, inoculados con la bacteria *X. albilineans*, no sólo son capaces de producir las glicoproteínas propias de la caña de azúcar, HMMG y MMMG, cuya separación se logra por filtración a través de un sistema de columnas de Sephadex G-10 conectada en serie con una columna de Sephadex G-50 (**Fig. 53 A y B**), sino que, como consecuencia de la infección, la bacteria a su vez es capaz de sintetizar un polisacárido con un peso molecular superior al de las HMMG de la planta (Martínez *et al.*, 1990), el cual ha sido identificado como xantano.

Una diferencia fundamental entre las HMMG y los polisacáridos con peso molecular superior al de las HMMG radica en el contenido proteico, como ya se explicó en el apartado 1.4 de la Introducción. Las HMMG son glicoproteínas (Legaz *et al.*, 1995), y las macromoléculas de peso molecular superior al de las HMMG tan solo aparecen después de la infección con la bacteria y su contenido proteico es prácticamente nulo (**Fig. 58**), siendo de naturaleza exclusivamente polisacáridica.

En las **Figs. 54 y 55** se representa el contenido en azúcares totales procedentes de las fracciones de polisacáridos insolubles en alcohol *iso*-propílico obtenidas de plantas sin inocular, de las HMMG (de plantas inoculadas y sin inocular) y de los xantanos aislados a partir de segmentos de caña de azúcar inoculados con la bacteria durante los 9 días que duró el experimento.

A partir del día quinto hasta el noveno, los niveles de HMMG procedentes de segmentos inoculados aumentaron de forma constante como respuesta al proceso de infección. En el noveno día se alcanzaron los niveles más altos de las HMMG como consecuencia de un mayor tiempo de contacto entre los segmentos de caña de azúcar y la bacteria. La **Fig. 56** muestra la variación de la producción de las HMMG obtenida a lo largo de los 9 días de tratamiento procedente de los jugos de caña de azúcar procedentes de los segmentos inoculados con la bacteria y de los segmentos sin inocular. La respuesta al proceso de infección queda patente en esta gráfica, traduciéndose en que los niveles más altos de las HMMG se obtienen en el último día de tratamiento en los segmentos inoculados. Este proceso puede sin duda encuadrarse en una respuesta de defensa generalizada de las plantas frente a la invasión por patógenos, como ha sido demostrado en diferentes ocasiones y para diferentes agentes infectantes, hongos (DeWitt, 1992), bacterias (Rao, 1995) o virus (Tavlodarakí *et al.*, 1993).

Reacciones de defensa de este tipo en caña de azúcar, envolviendo tanto HMMG como MMMG, habían sido previamente demostradas para la infección por *U. scitaminea* (Millanes *et al.*, 2005), como para el virus del amarilleamiento foliar (Fontaniella *et al.*, 2003 b). En la **Fig. 57** queda reflejada la capacidad de la bacteria para producir un polisacárido con peso molecular superior al de las HMMG, identificado como xantano, procedente de los segmentos de caña de azúcar inoculados con la bacteria. La producción de este polisacárido se mantuvo constante durante los 9 días que duró el experimento, con ligeras oscilaciones.

Estos hechos plantean conflictos de interpretación de difícil solución en los momentos actuales. Tales conflictos podrían resumirse de la manera siguiente:

1º Generalmente, las proteasas son una de las bases de la infectividad tanto bacteriana como fúngica (Ryan, 1990). El hecho de que inhibidores de las proteasas de *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani* produzcan secundariamente inhibición de la germinación de las esporas y del crecimiento del tubo germinativo (Lorito *et al.*, 1994) es indicativo de este aserto.

2º *X. campestris* también produce proteasas relacionadas con su capacidad infectiva (Roden *et al.*, 2004) y algo semejante sucede con *X. fastidiosa* (Leu y Su, 1993). También en ambos casos se trata de proteasas segregables al exterior celular. *X. campestris* segrega dos proteasas la principal de las cuales resulta ser una serín proteasa (Kalashnikova *et al.*, 2003). También se segregan dos proteasas de *X. fastidiosa*, perteneciendo en este caso una a las serín proteasas y la segunda, al grupo de las metalo-proteasas (Fedatto *et al.*, 2006). Sin embargo, tales proteasas no afectan la producción y secreción de xantanos en cultivo, al contrario de lo descrito en nuestros Resultados relativos a *X. albilineans*. Al no haberse detectado niveles altos de secreción de proteasas de *X. albilineans* a los medios de cultivo, es evidente que en ello debe radicar su acción sobre las proteínas citoplásmicas.

3º El hecho de que UDPG-dh de *X. albilineans* (O_2 /NADPH dependiente) sea diferente a las deshidrogenasas de otras bacterias (NAD^+ dependientes), *X. campestris* incluida, podría estar relacionado con su susceptibilidad a las proteasas bacterianas, pero esta hipótesis tendría que ser experimentalmente demostrada.

4º La dependencia de oxígeno impone el que la bacteria, dentro de la caña y produciendo activamente xantano, deba tener a su disposición la cantidad de oxígeno suficiente para que la oxido-reductasa trabaje a una velocidad conveniente.

A la luz de los resultados obtenidos, estas cuestiones deberán ser consideradas como hipótesis de trabajos experimentales subsecuentes.

Para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento, se procedió al análisis por Electroforesis Capilar con polaridad ánodo-cátodo de las fracciones comprendidas entre los 58 mL y los 70 mL correspondientes a los polisacáridos con

peso molecular superior al de las HMMG. La separación de estas fracciones por Electroforesis Capilar reveló que las HMMG de la caña de azúcar procedentes del tratamiento control producen dos picos que absorben a 200 nm (**Fig. 59 A**) y al menos un pico que absorbe a 280 nm (**Fig. 59 B**), mientras que este último pico, absorbiendo a 280 nm, no aparece después del análisis de segmentos inoculados con la bacteria (**Fig. 60 A y B**).

Teniendo en cuenta que la fructosa y el galactitol son los únicos componentes de la mitad polisacáridica de las HMMG como de las MMMG (Vicente *et al.*, 1991; Legaz *et al.*, 2005), polisacáridos característicos producidos por las células de la caña de azúcar después de la infección, mientras que UDP-GlcA es el monómero estructural característico del xantano producido por la bacteria (Fontaniella *et al.*, 2002 b), la presencia de uno u otros en los hidrolizados de las diferentes fracciones obtenidas a partir de tejidos infectados podría ser suficiente para caracterizar el origen (bacteriano o de la planta) de la macromolécula hidrolizada.

Como se muestra en la **Fig. 61 B**, sólo los polisacáridos obtenidos a partir de segmentos de caña de azúcar previamente inoculados con la bacteria *X. albilineans* liberan UDP-GlcA, así como manosa, además de glucosa y glucosa 1-P (esta última sería utilizada como donador de glucosa durante la producción de xantanos) después de su hidrólisis ácida, mientras que lo que se obtiene a partir de segmentos de caña de azúcar sin inocular parecen ser glucanos, ya que solamente se obtiene la liberación de glucosa del polímero (**Fig. 61 A**), no detectándose ni manosa ni UDP-GlcA. Llegados a este punto, se puede decir que la bacteria fitopatógena *X. albilineans*, invade los tejidos de almacenamiento de la caña de azúcar y es capaz de producir xantano (constituido por un tetrámero basal formado por dos restos de glucosa, uno de manosa y uno de ácido glucurónico, que se repite sucesivas veces para formar la macromolécula), que difiere en gran medida de la estructura de las glicoproteínas producidas por la planta.

Esta capacidad de producir dichos xantanos requiere una previa inactivación de las proteasas bacterianas llevada a cabo por las glicoproteínas de la caña tal y como se detalla en el apartado 5.3 de la Discusión. De esta forma, la enzima UDPG-dh estaría activa y llevaría a cabo la reacción que cataliza obteniéndose como producto el ya mencionado UDP-GlcA.

5.5. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN DE LA SACAROSA ORIGINADAS POR EL XANTANO PRODUCIDO POR *X. albilineans*.

5.5.1 Concepto de cristalización y tipos de cristales.

El fenómeno de cristalización es aquel por el cual se separa un componente de una disolución líquida transfiriéndolo a la fase sólida en forma de cristales que precipitan. Es una operación necesaria para todo producto químico que se presenta comercialmente en forma de polvos o cristales, ya sea el azúcar o sacarosa, la sal común o cloruro sódico, u otros. Para poder ser transferido a la fase sólida, es decir, cristalizar, un soluto cualquiera debe eliminar su calor latente o entalpía de fusión, por lo que el estado cristalino además de ser el mas puro, es el de menor nivel energético de los tres estados físicos de la materia, en el que las moléculas permanecen inmóviles unas respecto a otras, formando estructuras en el espacio, con la misma geometría, sin importar la dimensión del cristal.

5.5.1.1. Tipos de cristales

Un cristal puede ser definido como un sólido compuesto de átomos dispuestos en orden, en un modelo de tipo repetitivo. La distancia interatómica en un cristal de cualquier material definido es constante y es una característica del material. Debido a que el patrón o disposición de los átomos es repetido en todas direcciones, existen restricciones definidas en el tipo de simetría que el cristal posee. La forma geométrica de los cristales es una de las características de cada sal pura o compuesto químico, por lo que la ciencia que estudia los cristales en general, la cristalografía, los ha clasificado en siete sistemas universales de cristalización:

Sistema Cúbico

Las sustancias que cristalizan bajo este sistema forman cristales de forma cúbica, los cuales se pueden definir como cuerpos en el espacio que manifiestan tres ejes en ángulo recto, con "segmentos", "látices", ó "aristas" de igual magnitud, que forman seis caras o lados del cubo. A esta familia pertenecen los cristales de oro, plata, diamante, cloruro sódico, etc.

Sistema Tetragonal

Estos cristales forman cuerpos con tres ejes en el espacio en ángulo recto, con dos de sus segmentos de igual magnitud, hexaedros con cuatro caras iguales, representados por los cristales de óxido de estaño.

Sistema Ortorrómbico

Presentan tres ejes en ángulo recto pero ninguno de sus lados o segmentos son iguales, formando hexaedros con tres pares de caras iguales pero diferentes entre par y par, representados por los cristales de azufre, nitrato potásico, sulfato de bario, etc.

Sistema Monoclínico

Presentan tres ejes en el espacio, pero sólo dos en ángulo recto, con ningún segmento igual, como es el caso del bórax y de la sacarosa.

Sistema Triclínico

Presentan tres ejes en el espacio, ninguno en ángulo recto, con ningún segmento igual, formando cristales ahusados como agujas, como es el caso de la cafeína.

Sistema Hexagonal

Presentan cuatro ejes en el espacio, tres de los cuales son co-planares en ángulo de 60° , formando un hexágono bencénico y el cuarto en ángulo recto, como son los cristales de zinc, cuarzo, magnesio, cadmio, etc.

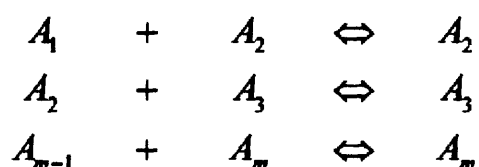
Sistema Romboédrico

Presentan tres ejes de similar ángulo entre sí, pero ninguno es recto, y segmentos iguales, como son los cristales de arsénico, bismuto y carbonato de calcio y mármol.

5.5.2 Crecimiento, propiedades de los cristales y velocidad de cristalización.

La cristalización a partir de una disolución es un ejemplo de la creación de una nueva fase dentro de una mezcla homogénea. El proceso tiene lugar en dos etapas. La primera de ellas consiste en la formación del cristal y recibe el nombre de nucleación. La segunda corresponde al crecimiento del cristal. El potencial impulsor de ambas etapas es la sobresaturación, de forma que ni la nucleación ni el crecimiento tendrán lugar en una disolución saturada o insaturada. El fenómeno de la nucleación se produce como consecuencia de rápidas fluctuaciones locales a escala molecular en una fase homogénea que está en estado de equilibrio meta-estable. Los núcleos cristalinos se pueden formar a partir de moléculas, átomos, o iones. En disoluciones acuosas pueden estar hidratados. Debido a sus rápidos movimientos, estas partículas reciben el nombre de unidades cinéticas. Gracias a fluctuaciones constantes, una unidad cinética individual penetra con frecuencia en el campo de fuerza de otra y las dos partículas se unen momentáneamente; lo normal es que se separen inmediatamente, pero si se mantienen unidas, se pueden unir sucesivamente a ellas otras partículas. Las combinaciones de este tipo reciben el nombre de agregados.

La unidad de partículas, de una en una, a un agregado constituye una reacción en cadena que se puede considerar como una serie de reacciones químicas reversibles de acuerdo con el siguiente esquema:



donde A_1 es la unidad cinética elemental, y el subíndice representa el número de unidades que forman el agregado. Cuando "m" es pequeño, un agregado no se comporta como una partícula que forma una nueva fase con una identidad y límite definidos. Al aumentar "m", el agregado se puede ya reconocer y recibe el nombre de embrión. La inmensa mayoría de los embriones tienen una vida muy corta, rompiéndose para volver a formar agregados o unidades individuales. Sin embargo, dependiendo de la sobresaturación, algunos embriones crecen hasta un tamaño suficiente para alcanzar el equilibrio termodinámico con la solución. En este caso el embrión recibe el nombre de núcleo.

El valor de "m" para un núcleo está comprendido en el intervalo de unas pocas unidades a varios centenares. El valor de "m" para los núcleos de agua líquida es del orden de 80. Los núcleos se encuentran en equilibrio inestable: si pierden unidades se disuelven y si las ganan se transforman en un cristal. La secuencia de etapas en la formación de un cristal es, por consiguiente

Agregado \Rightarrow embrión \Rightarrow núcleo \Rightarrow cristal

La velocidad de crecimiento de un cristal es conocida como velocidad de cristalización. El crecimiento ocurre primero con la formación del núcleo, y luego con su crecimiento gradual. El crecimiento del cristal es un proceso capa por capa y, ya que sólo puede ocurrir en la cara del cristal, es necesario transportar material a dicha cara desde la solución. Por consiguiente, debe considerarse la resistencia de difusión al desplazamiento de las moléculas (o iones) hacia la cara creciente del cristal y la resistencia a la integración de estas moléculas a la cara (Hartel, 2001; Blanshard *et al.*, 1991, Hynes y LePage, 1991; Beevers, 1952) como limitantes del proceso de crecimiento. Atendiendo a estos conceptos teóricos relacionados con el fenómeno de la cristalización, en esta última fase del presente trabajo se ha estudiado las posibles alteraciones producidas en el patrón de cristalización de la sacarosa en presencia del xantano segregado por *X. albilineans*. El patrón de cristalización de la sacarosa comienza por la formación de cristales irregulares en forma de prisma creciendo en sus superficies laterales (**Fig. 67**).

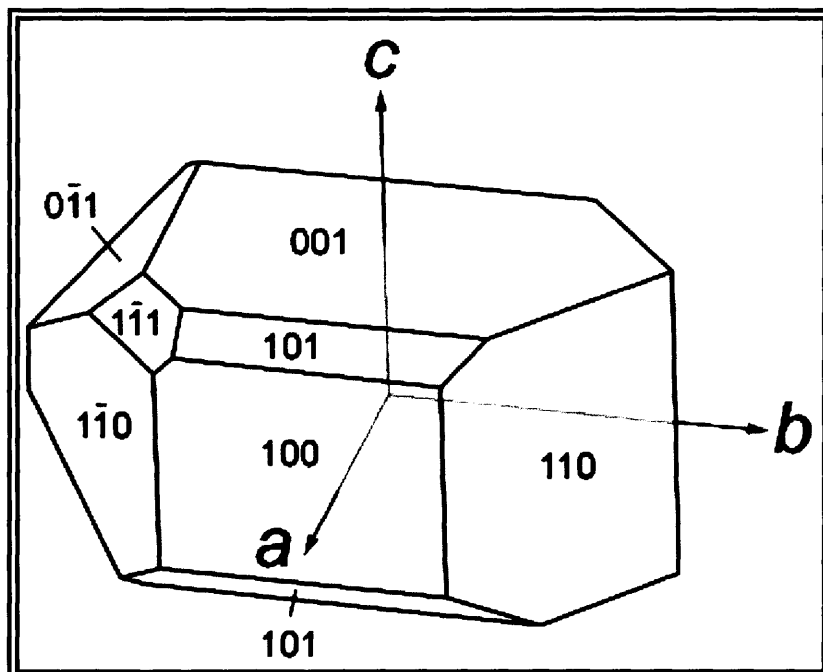


Figura 67: Modelo de un cristal de sacarosa. Experimentos de rayos X y de difracción de neutrones revelan que la sacarosa cristaliza en el espacio con unas unidades de dimensión celular $a=10,8631 \text{ \AA}$, $b=8,7044 \text{ \AA}$, $c=7,7624 \text{ \AA}$, y un ángulo monoclinico, $\beta=102,938^\circ$.

Estos cristales se van agregando mediante pequeñas superficies anexas para producir cristales en forma de estrella. Se ha descrito que ciertos tipos de polisacáridos, principalmente heterofructanos producidos por la propia caña de azúcar, son capaces de modificar la secuencia de cristalización de la sacarosa, producto de interés comercial primario de este cultivo. La presencia de las glicoproteínas HMMG y MMMG, uniéndose a las caras inferiores de los cristales en forma de prisma, impiden la formación de complejos estrellados. El incremento en la síntesis de las estas glicoproteínas así como la elevada actividad detectada, puede interpretarse como mecanismo de respuesta frente a la entrada del patógeno (de Armas *et al.*, 1992 b; Vicente *et al.*, 2000, Fontaniella *et al.*, 2003 a).

Si el xantano sintetizado por la bacteria invade el tejido parenquimatoso del huésped en la fase avanzada de la enfermedad, la obtención de los jugos para su utilización industrial en la producción de azúcar mezclaría la propia sacarosa con las glicoproteínas de caña y con la goma bacteriana, lo cual puede modificar la conducta de cristalización del producto.

En una primera aproximación, se realizó una medida de sólidos solubles a partir de jugos de caña de azúcar procedentes de los entrenudos 1 y 2 de tallos inoculados y sin inocular con la bacteria. Dichas medidas se compararon con las obtenidas a partir de concentraciones de sacarosa conocidas (**Tabla XI y Fig.62**). Atendiendo a los resultados obtenidos, en donde los valores de sólidos solubles procedentes de los entrenudos de plantas sin inocular son iguales o superiores a los procedentes de entrenudos de plantas inoculadas, se podría pensar que el proceso de inoculación con la bacteria, afecte en cierta medida a la cuantificación de dichos sólidos solubles.

Se procedió a la cristalización semi-industrial de la sacarosa a partir de jugos de planta sana (exenta de xantanos) y de planta enferma (conteniendo xantanos) pasadas 6 y 24 h (**Fig. 63**). De la observación microscópica del proceso se observan notables diferencias en el patrón de cristalización obtenido en jugos producidos tras el tratamiento de inoculación frente a los obtenidos del tratamiento control.

La cristalización inicial de la sacarosa procedente de jugo de caña de azúcar inoculado con la bacteria, pasadas 6 h, disminuye drásticamente en comparación con el tratamiento control (**Fig. 63 A y B**). El proceso de cristalización total de la sacarosa transcurridas 24 h difiere en gran medida en los tratamientos de inoculación. En ellos, la formación de cristales es reducida y estos complejos aunque tratan de mantener la forma de estrella, presentan núcleos amorfos, poco definidos y en algunos casos el proceso de agregación es prácticamente nulo (**Fig. 63 C y D**).

Llegados a este punto, a partir de disoluciones saturadas de sacarosa pura se le adicionaron o no, xantanos previamente purificados obtenidos a partir de plantas de caña de azúcar enfermas, tal y como se explica en el apartado 3.11.5. de Material y Métodos. De esta forma, se pudo llevar a cabo una simulación *in vitro* del efecto producido por estos polisacáridos bacterianos en el proceso de cristalización de la sacarosa cuando ambos compuestos se mezclan en jugos de caña de azúcar infectados (**Fig. 65**).

Mediante este procedimiento se ha podido comprobar que la presencia de xantanos en los medios de cristalización disminuye la producción de cristales de sacarosa y aquellos que se producen no llegan a fases avanzadas de complejidad estructural (agregados de cristales en forma de estrella) e incluso aparecen deformados. Esta inhibición de la cristalización es posible por la adhesión de las moléculas de polisacárido a los puntos de contacto entre cristales en las bases y en las caras laterales del prisma, desplazando las moléculas de agua que los impregnan como medio que propicia el contacto.

Sin embargo el proceso de cristalización de la sacarosa en los tratamientos control sin la adición del xantano muestra un comportamiento totalmente diferente tanto a las 4, 6 y 24 h que duró el experimento.

En etapas tempranas del proceso (4-6 h) se producen formaciones de cristales irregulares con forma de prisma que van creciendo y agregándose con los más próximos (**Fig. 66 A y B**), llegándose a obtener auténticos cristales estrellados cuando el proceso de cristalización ha sido completado (estimado a las 24 h) tal y como queda reflejado en la **Fig. 66 C** (Blanch *et al.*, 2006).

Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el proceso de inoculación con la bacteria *X. albilineans* trae consigo la síntesis de xantanos que, al interferir con la sacarosa presente en el jugo de caña, alteran en gran medida el patrón de cristalización de la misma. A esto hay que añadir que la presencia de la bacteria trae consigo un aumento en la síntesis de las glicoproteínas sintetizadas por la propia planta (como sistema de respuesta a la entrada del patógeno) y esto a su vez genera nuevas interferencias en la cristalización de la sacarosa traducándose en una disminución en la formación de cristales y en el caso de que éstos lleguen a formarse, su estructura está notablemente modificada con cristales estrellados pero erosionados y partidos, cosa que no ocurre en condiciones normales, donde se alcanza un grado de cristalización completa, propia de un sistema monoclínico.

6. CONCLUSIONES

1. Del proceso de purificación y caracterización de la enzima UDPG-dh procedente de *X. albilineans* se han obtenido conclusiones relevantes.

✓ Dicha enzima cataliza una reacción redox (diferente a la llevada a cabo por otras UDPG-deshidrogenasas procedentes de otros organismos), usando en este caso UDPG como sustrato, NADPH como cofactor y oxígeno molecular para la oxidación del NADPH.

✓ Su sensibilidad a la acción de las proteasas bacterianas hace necesario incluir en las mezclas de reacción un cocktail de inhibidores de proteasas para poder detectar una correcta actividad enzimática.

✓ Del proceso de purificación de UDPG-dh mediante la técnica de Electroforesis Capilar se ha obtenido un único pico con un tiempo de migración de 32,44 min. Esta enzima se comporta como una proteína aniónica y su pI es de 8,98.

✓ Su peso molecular ha sido estimado en 14,10 KDa, relativamente bajo si se compara con el obtenido para otras deshidrogenasas procedentes de otras fuentes.

✓ Sus constantes cinéticas también difieren de las obtenidas para la misma enzima pero procedente de otros seres vivos. El valor de K_m para UDPG (sustrato de la enzima), ha sido de 0,87 mM. Se comporta como una enzima alostérica frente a NADPH, con un coeficiente de interacción de 3,0. Para concentraciones de NADPH superiores a 0,22 mM, la enzima queda inhibida.

✓ El pH óptimo de esta UDPG-dh de *X. albilineans* ha sido de 6,8 y su temperatura óptima es de 37°C. Dichos valores vuelven a diferir de los obtenidos para deshidrogenasas procedentes de otras fuentes.

✓ La secuencia del extremo N-terminal de UDPG-dh de *X. albilineans* ha sido determinada como **I** (Isoleucina), **Q** (Glutamina), **P** (Prolina), **Y** (Tirosina), **N** (Asparagina), **H** (Histidina). Mientras que la metionina es el aminoácido N-terminal de la mayoría de las deshidrogenasas conocidas, en el caso de UDPG-dh de *X. albilineans* es la Isoleucina.

2. Las glicoproteínas HMMG y MMMG procedentes de la caña de azúcar muestran tener un papel inhibitorio frente a las proteasas sintetizadas por *X. albilineans*. A diferencia de las proteasas sintetizadas por *X. campestris* o *X. fastidiosa*, las proteasas de *X. albilineans* no son segregables al exterior celular, de ahí su acción sobre las proteínas citoplásmicas.

Las glicoproteínas HMMG y MMMG se sintetizan después de que las cañas sufran un daño mecánico o la invasión de un patógeno, como es el caso de *X. albilineans*. Llevada a cabo la inhibición de las proteasas bacterianas, es entonces cuando la actividad de la enzima UDPG-dh es convenientemente detectable. Por tanto, la susceptibilidad de la planta a la infección depende de la capacidad de la misma para producir dichas glicoproteínas, capaces de inhibir a las proteasas bacterianas.

Además, UDPG-dh ha mostrado tener un comportamiento diferente al esperado cuando se han utilizado inhibidores específicos frente a su actividad, como es el caso de la piperina, permaneciendo inalterada dicha actividad en presencia del inhibidor.

3. *Xanthomonas albilineans* es capaz de sintetizar un xantano el cual está estrechamente vinculado con la patogenicidad de la bacteria. Para poder llevar a cabo la síntesis de este exopolisacárido, es necesario que la enzima UDPG-dh esté activa, ya que es la responsable de catalizar la reacción enzimática en la que se obtiene como producto el UDP-GlcA (monómero estructural de la molécula del xantano producido por *X. albilineans*). El xantano solo se produce cuando las proteasas bacterianas han sido previamente inhibidas. Por ello, *X. albilineans* no produce xantano en cultivo, aunque sí lo produce en el tejido infectado de caña.

4. Los componentes estructurales de la molécula del xantano, han sido analizados mediante Electroforesis Capilar, concluyéndose que está formado por un tetrámero basal compuesto por dos restos de glucosa, uno de manosa y uno de ácido glucurónico, que se repite sucesivas veces para formar la macromolécula.

5. El proceso de inoculación de tallos de caña de azúcar con *X. albilineans* trae consigo la síntesis de xantanos que interfieren con la sacarosa presente en los jugos de caña, alterando en gran medida el patrón de cristalización de la misma. Además, la presencia de la bacteria, desencadena un incremento en la síntesis de las glicoproteínas de la caña de azúcar como sistema de defensa frente a la entrada del patógeno y esto genera nuevas interferencias en el proceso de cristalización de la sacarosa traduciéndose en una disminución en la formación de cristales y en el caso de que lleguen a formarse, su estructura está notablemente modificada con cristales estrellados pero erosionados y partidos, cosa que no ocurre en condiciones normales, donde se alcanza un grado de cristalización completa, propia de un sistema monocínico.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agnihotri, V.P.** (1990): Diseases of sugarcane and sugarbeet. Revised edition. Oxford and IBH Publishing Co. PVT. LTD. New Delhi. 483 p.
2. **Alexander, A.G.** (1973): Sugarcane Physiology, Elsevier, Amsterdam, pp. 348-355.
3. **Aloni, B.; Wyse, R.E. and Griffith, S.** (1986): Sucrose transport and phloem unloading in stem of *Vicia faba*: posible involment of a sucrose carrier and osmotic regulation. *Plant Physiology*, **81**: 482-486.
4. **Amaral, A.; de Armas, R.; Bejottes, M.; de la Fuente, E.; Pardo, J. and Pérez, A.M.** (1971): Estudio del ciclo de corte de algunas variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba. *Monografías, Universidad de La Habana.Cuba*.
5. **Ankel, H.; Ankel, E. and Feingold, D.S.** (1966): Biosynthesis of uridine diphosphate D-xylose. 3. Uridine diphosphate D-glucose dehydrogenase of *Cryptococcus laurenti*. *Biochemistry*, **5**: 1864-1869.
6. **Arruda, S. and Amaral, J.** (1945): Leaf scald of sugar cane in Brasil. *Phytopathology*, **35**: 135-137.
7. **Ashby, S.F.** (1929): The bacterium which causes gumming disease of sugar canes with notes on two other bacterial diseases of the same host. *Tropical Agriculture*, **6**: 135-138.
8. **Atkinson, H.J.; Urwin, P.E.; Hansen, E. and McPherson, M.J.** (1995): Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. *Trends Biotechnology*, **13**: 369-374.
9. **Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, B and Sánchez-Tamés, R.** (2001): Transporte por el floema. En: Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide, Madrid. Pp 103-120.
10. **Basnayake, W.V.S. and Birch, R.G.** (1995): A gene from *Alcaligenes denitrificans* that confers albicidin resistance by reversible antibiotic binding. *Microbiology*, **141**: 551-560.
11. **Batta, S.H. and Singh, R.** (1986): Sucrose metabolism in sugar cane growth under varying climatic conditions: synthesis and storage of sucrose in relation to the activities of sucrose and invertase. *Photochemistry*, **25**: 2431-2431.
12. **Beevers, C.A.** (1952): The crystal structure of sucrose. *Acta Crystallographica*, **5**: 689-690.
13. **Birch, R. G. and Patil, S. S.** (1985a): Antibiotic and process for the production thereof. U. S. patent **4**: 525-354.
14. **Birch, R. G. and Patil, S. S.** (1985b): Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. L. *General Microbiology*, **131**: 1069-1075.

- 15. Birch, R. G. and Patil, S. S. (1987a):** Correlation between albicidin production and chlorosis induction by *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **30**: 199-206.
- 16. Birch, R. G. and Patil, S. S. (1987b):** Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Molecular Plant Pathology*, **30**: 207-214.
- 17. Blanch, M.; Legaz, M.E. and Vicente, C. (2006):** Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. *Journal of Plant Physiology*, (aceptado).
- 18. Blanch, M.; Rodríguez, C.; Legaz, M.E. and Vicente, C. (2006):** Modifications of sucrose crystallization by xanthans produced by *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. *Sugar Technology*, **4**: 255-259.
- 19. Blanco, Y.; Arroyo, M.; Legaz, M.E. and Vicente, C. (2005):** Isolation from *Gluconacetobacter diazotrophicus* cell walls of specific receptors for sugarcane glycoproteins, which act as recognition factors. *Journal of Chromatography A*, **1093**: 204-211.
- 20. Blanco, Y.; Blanch, M.; Piñón, D.; Legaz, M.E. and Vicente, C. (2005):** Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *Journal of Bioscience Bioengineering*, **99**: 366-371.
- 21. Blanco, Y.; Sacristán, M.; Legaz, M.E. and Vicente, C. (2006):** Isolation of specific receptors from *Xanthomonas albilineans* cell walls for lectins-like glycoproteins of sugarcane. *Journal Plant Interaction*, **1**: 107-114.
- 22. Blanshard, J.M.; Muhr, A.H. and Gough, A. (1991):** Crystallization from concentrated sucrose solutions. In: Levine H, Slade L, eds. *Water Relationships in Foods*. New York: Plenum Press; 639-655.
- 23. Bostock, J.M.; Huang, G.; Hashimi, S.M.; Zhang, L. and Birch, R.G. (2006):** A DHA 14 drug efflux gene from *Xanthomonas albilineans* confers high-level albicidin antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, **101**: 151-160.
- 24. Bruijin, J. (1970):** Enzymatic hydrolysis of the polysaccharides formed by sugarcane after harvesting. *International Sugar Journal*, **72**:195-198.
- 25. Bull, T. (2000):** The Sugarcane Plant. In M. Hogarth and P. Allsopp, (eds.): *Manual of Cane Growing*, Bureau of Sugar Experimental Stations, Indooroopilly, Australia, pp. 71-83.
- 26. Bull, T.A. and Glasziou, K.T. (1979):** Sugarcane. In: J.V. Lovett and A. Lazen (eds.): *Australian Field Crops*, Angus and Robertson Publishers, Sydney, Australia, pp. 95-113.

- 27. Cadmus, M.C.; Knutson, C.A.; Lagoda, A.A.; Pittsley, J.E. and Burton, K.A.** (1978): Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, **20**:1003-1114.
- 28. Campbell, R. E., Sala, R. F.; van de Rijn, I. and Tanner, M. E.** (1997): Properties and kinetic analysis of UDP-glucose dehydrogenase from group A *Streptococci*. Irreversible inhibition by UDP-chloroacetol. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 3416-3422.
- 29. Campbell, R.E.; Mosimann, S.C.; van de Rijn, I.; Tanner, M.E. and N. C. J. Strynadka, N.C.J.** (2000): The first structure of UDP-Glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry*, **39**:7012-7023.
- 30. Capela, D.; Barloy-Hubler, F.; Gouzy, J.; Bothe, G.; Ampe, F.; Batut, J.; Boistard, P.; Becker, A.; Boutry, M.; Cadieu, E.; Dreano, S.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Kahn, D.; Kiss, E.; Lelaure, V.; Masuy, D.; Pohl, T.; Portetelle, D.; Puehler, A.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Renard, C.; Thebault, P.; Vandenbol, M.; Weidner, S. and Galibert, F.** (2001): Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **98**: 9877-9882.
- 31. Casanova, E.** (1982): Eficiencia agroindustrial azucarera. Ed. Científico-Técnica, La Habana. Cuba.
- 32. Casas, J.A. and García-Ochoa, F.** (1999): Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixtures. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **79**:25-31.
- 33. Chagas, C.M.; Rossetti, V. and Beretta, M.J.G.** (1992): Electron-microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *Journal of Phytopathology*, **134**: 306-312.
- 34. Chang, C. J.; Garnier, M.; Zreik, L.; Rossetti, V. and Bové, J.M.** (1993): Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, **27**: 137-142
- 35. Chang, K.W. Weng. S.F. and Tseng, Y.H.** (2001): UDP-glucose dehydrogenase gene of *Xanthomonas campestris* is required for virulence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **287**: 550-555.
- 36. Chinea, A. and Rodríguez, E.** (1994): Enfermedades de la caña de azúcar. Ediciones Imago, La Habana, 100 pp.
- 37. Clements, H.** (1959): Sugarcane nutrition and culture. Indian Institute of Sugar Cane Research. Lucknow, India. 189 p.

- 38. Cottrell, I. W. and Baird, J. K.** (1998): Gomas, en Enciclopedia de tecnología Química Kirk-Othmer, Limusa, 1998, traducción española de: Mark H.F., Othmer D.F., Overberger C. G., Seaborg G. T. (ed.), Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, New York.
- 39. Covacevich, M.E. and Richards, G.N.** (1977a): Studies on dextrans isolated from raw sugar manufactured from deteriorated cane. Part I. Isolation, purification and structure of dextrans. *International Sugar Journal*, **79**: 3-9.
- 40. Covacevich, M.E. and Richards G.N.** (1977b): Studies on dextrans isolated from raw sugar manufactured from deteriorated cane. Part II. Determination of structure using a bacterial dextranase. *International Sugar Journal*, **79**: 33-37.
- 41. Croft, B.; Magarey, R. and Whittle, P.** (2000): Disease management. In: Hogarth, D.M. and Allsopp, P.G. (Eds.) *Manual of cane growing*. BSES, Brisbane, pp. 263-289.
- 42. Da Silva, F.R., Vettore, A.L., Kemper, E.L., Leite, A. and Arruda, P.** (2001): Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiological Letters*, **203**: 165-171.
- 43. Daniels, J. and Roach, B.T.** (1987): Taxonomy and evolution. In: D.J. Heinz, (ed.): Sugarcane improvement Through Breeding. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Vol **11**, pp 7-84.
- 44. Davies, M.D. and Dickinson, D.B.** (1972): Properties of uridine diphosphoglucose dehydrogenase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **152**: 53-61.
- 45. Davis, M. J.; Gillaspie Jr, A. G.; Vidaver, A. K. and Harris, R. W.** (1984): *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **34**: 107-117.
- 46. Davis, M.J.; Rott, P.; Baudin, P. and Dean, J.L.** (1994): Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease*, **78**: 78-82.
- 47. Davis, M.J.; Rott, P.; Warmuth, C.J.; Chatenet, M. and Baudin, P.** (1997): Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology*. **87**: 316-324.
- 48. de Armas, R.; Martínez, M.; Rodríguez, C.W.; Legaz, M.E.; Mateos, J.L.; Caffaro, S.V. and Vicente, C.** (1992 a): The chemical nature of high molecular mass heterofructans from cane juice. *International Sugar Journal*, **94**: 147-149.

- 49. de Armas, R.; Martínez, M.; Vicente, C and Legaz, M.E.** (1999): Free and conjugated polyamines and phenols in raw and alkaline-clarified sugarcane juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 3086-3092.
- 50. de Armas, R.; Mateos, J.L.; Caffaro, S.; Legaz, M.E. and Vicente, C.** (1992 b): Changes in sucrose cristal shape induced by cane juice fructans. *International Sugar Journal* , **94**: 141-143.
- 51. de Luca, G.; Speziaie, P.; Rindi, S.; Baiduini, C. and Casteliani, A.A.** (1976): Effect of some nucleotides on the regulation of glycosaminoglycan biosynthesis. *Connective Tissue Research*, **4**: 247-254.
- 52. de Vuyst, L.; Vermeire, A.; Van Loo, J. and Vandamme, E.J.** (1987): Nutritional, physiological and process technological improvements of xanthan fermentation process. *Mec Fac Landbouwwet Rijkuniversität Gent*, **52**: 1881-900.
- 53. Dea, I.C.M.; Clark, A.H. and Mc Cleary, B.V.** (1986): Effect of galactose substitution patterns on the between xanthan and locust bean gum in aqueous media. *Agricultural and Biological Chemistry*, **12**:2995-3000.
- 54. Dea, I.C.M.; Morris, E.D.; Rees, D.A. and Welsh, E.J.** (1977): Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides and related systems. *Carbohydrates Research*, **57**: 249-72.
- 55. Dennis, D.T. and Blakeley, S.D.** (2000): Carbohydrate metabolism. In: Buchanan, B.B., Gruisem, W., Jones, R.L. (eds.): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, pp. 630-675. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland.
- 56. DeWitt, P.J.G.M.** (1992): Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **30**: 391-418.
- 57. D'Hont, A.; Ison, D.; Alix, K.; Roux, C. and Glaszmann, J.C.** (1998): Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, **41**: 221-225.
- 58. Díaz, M.; Peralta, E. and Iglesia, A.** (2000): *Xanthomonas albilineans* Haplotype B responsible for a recent sugarcane leaf scald disease outbreak in Cuba. *Plant Disease*, **85**: 334.
- 59. Dong, Z.; McCully, M.E.; Roboredo, M.R.; Cabadilla, C.F.; Ortega, F. and Rodes, R.** (1994): A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiology*, **105**: 1139-1142.
- 60. Dow, J.M.; Clarke, B.R.; Milligan, D.E.; Tang, J.L. and Daniels, M.J.** (1990): Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 2994-2998.

- 61. Dow, J.M.; Feng, J.X.; Barber, C.E.; Tang, J.L. and Daniels, M.J.** (2000): Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*, **146**: 885-891.
- 62. Dowson, W.J.** (1943): On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. *Transactions of the British Mycological Society*, **26**: 1-14.
- 63. Dubois, M.; Guilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A and Smith, D.** (1956): Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**: 350-356.
- 64. Dye, DW.** (1980): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, pp. 45-49. *American Phytopathological Society*, St.Paul, Minn.
- 65. Eschirch, W.** (1989): **Eschirch, W.** (1989): Phloem unloading of photoassimilates. In: D.A.Baker y J.A. Milburn, (eds). Transport of photoassimilates. Longman, Harrow, pp. 206-263.
- 66. Evtushenko, L.; Dorofeeva, L.; Subbotin, S.; Cole, J. and Tiedje, J.** (2000): *Leifsonia poae* gen. nov., sp nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al., 1984) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutive Microbiology*, **50**: 371-380.
- 67. Fedatto, L.M.; Silva-Stenico, M.E.; Etchegaray, A.; Pacheco, F.T.H.; Rodrigues, J.L.M. and Tsai, S.M.** (2006): Detection and characterization of protease secreted by the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiological Research*, **161**: 263-72.
- 68. Feldmann, P. and Daugrois, J.** (1997): First report of leaf scalds disease and ratoon stunting disease of sugarcane in French Guyana. *Plant Disease*, **81**: 969.
- 69. Fernandez, L. A. and Berenguer, J.** (2000): Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 21-44.
- 70. Flores-Candia, J. L.** (1998): Metabolic Flux Distribution, Modelling and Process Optimization of Xanthan Production, PhD Thesis, Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 172, Dusseldorf, VDI Verlag.
- 71. Fontaniella, B.; Márquez, A.; Rodríguez, C.W.; Piñón, D.; Solas, M.T., Vicente, C. and Legaz, M.E.** (2002a): A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 881-889.

- 72. Fontaniella, B.; Millanes, A.M.; Piñón, D.; Rodríguez, C.; Vicente, C. and Legaz, M.E.** (2003a): Effect of leaf scald on the content of sucrose and polysaccharides of two sugarcane cultivars. *Food Science and Biotechnology*, **12**: 346-350.
- 73. Fontaniella, B.; Millanes, A.M.; Vicente, C. and Legaz, M.E.** (2004): Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**: 773-779.
- 74. Fontaniella, B.; Rodríguez, C.W.; Piñón, D.; Vicente, C. and Legaz, M.E.** (2002b): Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Chromatography B*, **770**: 275-281.
- 75. Fontaniella, B.; Vicente, C.; Legaz, M.E.; De Armas, R.; Rodríguez, C.W.; Martínez, M.; Piñón, D.; Acevedo, R.; Solas, M.T.** (2003b): Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 1027-1036.
- 76. Fry, S.M.; Huang, J.S. and Milholland, R.D.** (1994): Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. *Phytopathology*, **84**: 357-363.
- 77. Funahashi, H.; Yoshida, T. and Taguchi, H.** (1987): Effect of Glucose Concentration on Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, *Journal of Fermentation Technology*, **65**: 603-606.
- 78. Gaaney, P. A. and Pheips, C. F.** (1972). Uridine diphosphate glucuronic acid production and utilization in various tissues actively synthesizing glycosaminoglycans. *Biochemical Journal*, **128**: 215-227.
- 79. Gancedo, J.M.** (1992): Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry*, **206**: 297-313.
- 80. García-Ochoa, F.; Santos, V. and Casas, J.** (2000a): Xanthan Gum: Production, Recovery and Properties. *Biotechnology Advances*, **18**: 549-579.
- 81. García-Ochoa, F.; Santos, V. and Casas, J.** (2000b): Xanthan Gum: Production and Isolation of Xanthan Gum, *In: Methods in Biotechnology, Vol. 10: Carbohydrate Biotechnology Protocols*, Humana Press, Totowa NJ, USA.
- 82. García-Ochoa, F.; Santos, V.E.; Alcón, A.** (1997): Xanthan gum production in laboratory aerated stirred tank bioreactor. *Journal of Chemistry Biochemistry Engineering*, **11**: 69-74.
- 83. García-Ochoa, F. and Casas, J.A.** (1992): Viscosity of locust bean (*Ceratonia siliqua*) gum solutions. *Journal Science Food and Agriculture*, **59**: 97-100.
- 84. Gil-Martínez, F.** (1995): Elementos de Fisiología Vegetal. Ed. Mundi Prensa, Madrid, pp. 627-666.

- 85. Grangeasse, C.; Obadia, B.; Mijakovic, I.; Deutscher, J.; Cozzone, A.J. and Doublet, P.** (2003): Autophosphorylation of the *E. coli* protein kinase wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 39323–39329.
- 86. Griffith, C.L.; Lutts, J.S.K.; Zhang, L.; Levery, S.B. and Doering, T.L.** (2004): UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 51669–51676.
- 87. Grisham, M. and B. Legendre.** (1993): First report of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* of sugarcane in Louisiana. *Plant Disease*, **77**: 537.
- 88. Guerrero, S.J.; Wulkop, J. y Hernández, A.** (1986): Caracterización de polímeros utilizados en la extracción mejorada de petróleo. *Revista Técnica INTEVEP* **6**: 105-119.
- 89. Guzmán, L.; Ángel, J.; Victoria, J. and Álvarez, A.** (1997): Diagnóstico de la escaldadura de la hoja *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson en caña de azúcar. *Fitopatología Colombiana*, **21**: 10-17.
- 90. Harding, N.E.; Cleary, J.M. and Ielpi L.** (1995): Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*, In: Y.H. Hui and G. Khachatourians (eds.), *Food Biotechnology Microorganisms*, pp. 495-514. VCH Publishers Inc., New York, N. Y.
- 91. Hartel, R.W.** (2001): *Crystallization in Foods*. Aspen Publishers, Inc., Nueva York, EE.UU.
- 92. Hassler, R.A.; and Doherty, D.H.** (1990): Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Progress*, **6**: 182-187.
- 93. Hatch, M.D. and Glasziou, K.T.** (1963): Sugar accumulation cycle in sugarcane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environments. *Plant Physiology*, **38**: 344-348.
- 94. Hatch, M.D.; Sacher, J.A. and Glasziou, K.T.** (1963): Sugar accumulation cycle in sugarcane. I Studies on enzymes of the cycle. *Plant Physiology*, **38**: 338-343.
- 95. Havarstein, L.S.; Holo, H. and Nes, I.F.** (1994): The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* **140**: 2383–2389.
- 96. Hayward, A.C.** (1974): Latent infection by bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **12**: 87-93.

- 97. Hickery, M.S.; Bayliss, J.; Dudhia, J.C.; Lewthwaite, J.C.E. and Pitsillides, A.A.** (2003): Age-related changes in the response of human articular cartilage to IL-1 alpha and transforming growth factor-beta (TGF-beta): chondrocytes exhibit a diminished sensitivity to TGF-beta. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 53063-53071.
- 98. Hinterberg, B.; Klos, C. and Tenhaken, R.** (2002): Recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 1011-1017.
- 99. Honig, P.** (1969): Principios de Tecnología Azucarera. Continental, México.
- 100. Huang, G.; Zhang, L. and Birch, R. G.** (2000a): Analysis of the genes flanking *xabB*: A methyltransferase gene is involved in albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. *Gene*, **255**: 327-333.
- 101. Huang, G.; Zhang, L. and Birch, R. G.** (2000b): Albicidin antibiotic and phytotoxin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans* requires a phosphopantetheinyl transferase gene. *Gene*, **258**: 193-199.
- 102. Huang, G.; Zhang, L. and Birch, R. G.** (2001): A multifunctional polyketide-peptide synthetase essential for albicidin biosynthesis in *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology*, **147**: 631-642.
- 103. Huber, B.B. and Moreland, D.E.** (1981): Co-transport of potassium and sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, **67**: 163-169.
- 104. Hugouvieux, V.; Barber, C.E. and Daniels, M.J.** (1998): Entry of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: A system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**: 537-543.
- 105. Hui, P.A. and Neukon, H.** (1964): Some properties of galactomannans. *Tappi Journal*, **47**: 39-42.
- 106. Humbert, R.P.** (1974): El cultivo de la caña de azúcar. Continental, México.
- 107. Hynes, R.C. and LePage, Y.** (1991): Sucrose, a convenient test crystal for absolute structures. *Journal of Applied Crystallography*, **24**: 352-354.
- 108. Imrie, F.K. and Tilbury, R.H.** (1972): Sugar Technology Reviews. Elsevier. Amsterdam.
- 109. Irvine, J. and Amador, J.** (1993): First report of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* of sugarcane in México. *Plant Disease*, **77**: 846.
- 110. Irvine, J.E.** (1975): The relations of photosynthetic rates and leaf and canopy characters to sugarcane yield. *Crop Science*, **15**: 671-676.
- 111. Isakeit, T. and Irvine, J.** (1995): First report of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* of sugarcane in Texas. *Plant Disease*, **79**: 860.

- 112. Jaenicke, R., Rudolph, R. and Feingold, D.S.** (1986): Dissociation and in vitro reconstitution of bovine liver uridine diphosphoglucose dehydrogenase. The paired subunit nature of the enzyme. *Biochemistry*, **25**: 7283-87.
- 113. Jeanes, A.; Rogovin, P.; Cadmus, M.C.; Silman, R.W. and Knutson, C.A.** (1976): Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures of culture maintenance and polysaccharide production purification and analysis. ARS-NC-51. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois.
- 114. Jiménez, O.; Contreras N. and Nass, H.** (2004): *Xanthomonas albilineans* causal agent of sugarcane (*Saccharum* sp) leaf scald disease in status Lara and Yaracuy. *Revista Facultad Agronomía*, **21**: 233-245.
- 115. Kai-Wei, C.; Shu-Fen, W. and Yi-Hsiung, T.** (2001): UDP-glucose dehydrogenase Gene of *Xanthomonas campestris* is required for virulence. *Biochemistry Biophysics and Research Communications*, **287**: 550-555.
- 116. Kalashnikova, E.E.; Chernyshova, M.P. and Ignatov, V.V.** (2003): The extracellular proteases of the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*, **72**: 443-447.
- 117. Kennedy, J.F.; Jones, P.; Barker, S.A. and Banks G.T.** (1982): Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. *Enzyme Microbiology and Technology*, **4**:39-43.
- 118. Klotz, I.M. and Hunston, D.** (1975): Protein interactions with small molecules. Relationships between stoichiometric binding constants, site binding constants, and empirical binding parameters. *Journal of Biological Chemistry*, **250**: 3001-3009.
- 119. Krasil'nikov, N.A.** (1949): Opredelitel' bakterii i aktinomitsetov [Guide to the bacteria and actinomycetes]. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva-Leningrad, USSR.
- 120. Kumar, M.A.; Timm, D.E.; Neet, K.E.; Owen, W.G.; Peumans, W.J. and Rao, A.G.** (1993): Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 25176-25183.
- 121. Lally, E.T.; Hill, R.B.; Kieba, I.R. and Korostoff, J.** (1999): The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiology*, **7**: 356-361.
- 122. Lee, P.K.; Chang, H.N. and Kim, B.H.** (1989): Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation. *Biotechnology Letters*, **11**:573-578.

-
- 123. Legaz, M.E. and Pedrosa, M.M.** (1993): Separation of acidic proteins by capillary zone electrophoresis and size-exclusion high-performance liquid chromatography: a comparison. *Journal of Chromatography*, **655**: 21-29.
- 124. Legaz, M.E.; de Armas, R.; Barriguete, E. and Vicente, C.** (2000): Binding of soluble glycoproteins from sugarcane juice to cells of *Acetobacter diazotrophicus*. *International Microbiology*, **3**: 177-182.
- 125. Legaz, M.E.; de Armas, R.; Millanes, A.M.; Rodríguez, C.W. and Vicente, C.** (2005): Heterofructan-containing glycoproteins from sugarcane: Structure and function. *Recent Research Developments in Biochemistry*, **6**: 31-51.
- 126. Legaz, M.E.; Fontaniella, B.; Millanes, A.M. and Vicente, C.** (2004): Secreted arginases from phylogenetically far-related lichens species act as cross-recognition factors for two different algal cells. *European Journal of Cell Biology*, **83**: 435-446.
- 127. Legaz, M.E.; Martín, L.; Pedrosa, M.M.; Vicente, C.; de Armas, R.; Martínez, M.; Medina, I. and Rodríguez C.W.** (1990): Purification and partial characterization of a fructanase which hydrolyzes natural polysaccharides from sugarcane juice. *Plant Physiology*, **92**: 679-683.
- 128. Legaz, M.E.; Pedrosa, M.M.; de Armas, R.; Rodríguez, C.W.; de los Ríos, V. and Vicente, C.** (1998): Separation of soluble glycoproteins from sugarcane juice by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, **372**: 201-208.
- 129. Legaz, M.E.; Pedrosa, M.M.; Martínez, M. and Vicente, C.** (1995): Soluble glycoproteins from sugar cane juice analyzed by SE-HPLC and fluorescence emission. *Journal of Chromatography*, **697**: 329-335.
- 130. Leu, L.S.; Su, CC.** (1993): Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease*, **77**: 642-646.
- 131. Levander, F. and Rådström, P.** (2001): Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharide biosynthesis in glucose and lactose-utilizing *Streptococcus thermophilus*. *Applied Environmental Microbiology*, **67**: 2734-2738.
- 132. Li, Y.Z., Tang, D.J. and Ma, Q.S.** (2001): Pathogenicity of EPS-deficient mutants (gum B(-), gum D(-) and gum E(-)) of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Progress in Natural Sciences*, **11**: 871-875.
- 133. Lind, T.; Falk, E.; Hiertson, E.; Kusche-Gullberg, M. and Lidholt, K.** (1999): cDNA cloning and expression of UDPglucose dehydrogenase from bovine kidney. *Glycobiology*, **9**: 595-600.
- 134. Littman, W.** (1988) Polymer flooding, pp.29-38. Elsevier Science Publishing Co. Inc., Amsterdam.

- 135. Liu, W., Sato, T., Norisuye, T. and Fujita, H.** (1987): Thermally induced conformational change of xanthan in 0.01 M aqueous sodium chloride. *Carbohydrate Research*, **160**: 267-281.
- 136. López-Bellido, L.** (2002): Cultivos Industriales. Ed. Mundiprensa, Madrid.
- 137. Lorito, M.; Broadway, R.M.; Hayes, C.K.; Woo, S.L.; Noviello, C.; Williams, D.L.; Harman, G.E.** (1994): Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**: 525-527.
- 138. Lund, T., Lecourtier, J. and Muller, G.** (1990): Properties of xanthan solution after long-term heat treatment at 90°C. *Polymer Degradation and Stability*, **27**: 211-225.
- 139. Magrou, J.** (1937): In: Haudroy, P., Ehringer, G., Urbain, A., Guillot, G., and Magrou, J. (Ed.) *Dictionnaire des Bactéries Pathogènes pour l'Homme les Animaux et les Plantes*. 597 pp. Masson & Cie, Paris, France.
- 140. Maier, M.; Anderson, M.; Karl, C. and Magnuson, K.** (1993): Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums. In: Whistler RL, BeMiller JN, editors. *Industrial gums*, pp. 205-213. New York: Academic Press.
- 141. Marcu, O.; Stathakis, D.G. and Marsh, J.L.** (1999): Assignment of the UGDH locus encoding UDP-glucose dehydrogenase to human chromosome band 4p 15.1 by radiation hybrid mapping. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **86**: 244-45.
- 142. Martín, A.B. and Lema, E.R.** (1994): Enfermedades de la caña de azúcar. Imago, Ciudad Habana, Cuba.
- 143. Martín, J.; Abbott, E and Hughes, C.** (1961): Sugarcane diseases and their World distribution. In: Hughes CG, Abbott EV and Wismer CA (eds) *Sugarcane diseases of the world*. **Vol. 1: 499-527**. Elsevier Publ. Co. Amsterdam.
- 144. Martin, J.P. and Robinson, P.E.**; (1961): Leaf scald. In: Hughes CG, Abbott EV and Wismer CA (eds) *Sugarcane Diseases of the World*, **Vol. 1: 79-107**. Elsevier, Amsterdam.
- 145. Martínez, M.; Medina, I.; Naranjo, S.; Rodríguez, C.W.; de Armas, R.; Piñón, D.; Vicente, C and Legaz, M.E.** (2000): Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). *International Sugar Journal*, **102**: 445-448.
- 146. Martínez, M.; Legaz, M.E.; Paneque, M.; de Armas, R.; Pedrosa, M.M.; Medina, I.; Rodríguez, C.W. and Vicente, C.** (1990a): The origin of soluble fructans in sugar cane juice. *International Sugar Journal*, **92**: 155-159.

- 147. Martínez, M.; Legaz, M.E.; Paneque, M.; Domech, R.; de Armas, R.; Medina, I.; Rodríguez, C.W. and Vicente, C. (1990b):** Glycosidase activities and polysaccharide accumulation in sugar cane stalks during post-collection impairment. *Plant Science*, **72**: 193-198.
- 148. Meier, H. and Reid, J.S.G. (1982):** Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. *In*: Loewus F.A. and Tanner W. (Editors) *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)*, **13A**, Plant Carbohydrates, 418-471. Springer. Berlin.
- 149. Mijakovic, I.; Poncet, S.; Boei, G.; Maze, A.; Gillet, S.; Janet, E.; Decottignies, P.; Grangeasse, C.; Doublet, P.; Le Marechal, P. and Deutscher, J. (2003):** Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO Journal*, **22**: 4709-4718.
- 150. Millanes, A.M.; Fontaniella, B.; Legaz, M.E. and Vicente, C. (2005):** Glycoproteins from sugarcane plants regulate cell polarity of *Ustilago scitaminea* teliospores. *Journal of Plant Physiology*, **162**: 253-265.
- 151. Molina, M.C.; Muñiz, E.; and Vicente, C. (1993):** Enzymatic activities of algal-binding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. *Plant Physiology and Biochemistry*, **31**: 131-142.
- 152. Moore, P.H. (1987):** Anatomy and Morphology. *In*: D.J. Heinz (ed.): *Sugarcane Improvement through Breeding*, pp 273-311. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- 153. Mora, C.J. (1998):** Apuntes sobre el origen de la caña e historia del gremio panelero. *En*: *Manual de caña de azúcar para la producción de panela*. Corpoica, Sena. Bucaramanga, Colombia.
- 154. Moraine, R.A. and Rogovin, P. (1966):** Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **8**: 511-524.
- 155. Moraine, R.A. and Rogovin, P. (1971):** Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*, **13**: 381-391.
- 156. Morris, E.R., Rees, D.A., Young, G., Walkinshaw, M.D. and Darke, A. (1977):** Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution: a role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. *Journal of Molecular Biology*, **110**:1-16.
- 157. Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2000):** Regulation of carbohydrate catabolism. *Lehninger Principles of Biochemistry*, pp. 551-557. E. Geller Worth publishers: New York.

- 158. Neufeld, E.F. and Hall, C.W.** (1965): Inhibition of UDP-D-Glucose dehydrogenase by UDP-D-Xylose: a possible regulatory mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **19**: 456-461.
- 159. Nickell, Z.G. and Tanimoto, T.** (1968): Sugarcane ripening with chemicals. *Hawaiian Sugar Technologists*, 104-109.
- 160. North, D.** (1926): Leaf scald a Bacterial Disease of Sugarcane. The Colonial Sugar Refininc Co. Ltd., Sydney. Agricultural Report. No. 9.
- 161. Ogler, T and Goberdhan, L.** (1970): Leaf scald in Trinidad. Sugarcane Pathologist`s Newsletter, **5**: 35-57.
- 162. Ordman, A. B. and Kirwood, S.** (1977): UDPglucose dehydrogenase kinetics and their mechanistic implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, **481**: 25-32.
- 163. Ordosgoitti, A.; Manzano, A. and Aponte, A.** (1977): La escaldadura de la caña de azúcar en Venezuela. *Agronomía Tropical*, **27**: 235-252.
- 164. Oresnik, I.J.; Twelker, S. and Hynes, M.F.** (1999): Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Applied Environmental Microbiology*, **65**: 2833-2840.
- 165. Pan, Y.; Grisham, M and Burner, D.** (1997): A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Disease*, **81**: 189-194.
- 166. Paulsen, I.T.; Sliwinski, M.K. and Saier, M.H.J.** (1998): Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *Journal of Molecular Biology*, **277**: 573-592.
- 167. Petitou, M. and van Boeckel, C. A. A.** (2004): A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angewandte Chemie* (International Edition English). **43**: 3118-3133.
- 168. Pontis, H.G.** (1990): Fructans. In: P.H. Day (ed.): *Methods in Plant Biochemistry*. Vol: **2**, Carbohydrates, pp. 353-369. Academic Press, London, U.K.
- 169. Purseglove, J.W.** (1979): *Tropical crops: Monocotyledons*. Longman Group Ltd.London.
- 170. Rahme, E.J.; Stevens, S.F.; Wolfort, J. and Shao, R.G.** (1995): Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, **268**, 1899-1902.
- 171. Raju, C.B. and Wells, J. M.** (1986): Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. *Plant Disease*, **70**: 182-186.

- 172. Ramos, O.G.** (1995): Solera de la caña de azúcar. *En: El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. Cassalet, C., Torres, J.E., Cenicaña, I.C. (Eds.), Cali, Colombia.
- 173. Rao, A.G.** (1995): Antimicrobial peptides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**: 6-13.
- 174. Rao, V.S.R.; Qasba, P.K.; Balaji, P.V. and Chandrasekaran, R.** (1998): Conformation of Carbohydrates, pp. 303-329. Hardwood Academic Publ, Amsterdam.
- 175. Reiter, W.D. and Vanzin, G.F.** (2001). Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants. *Plant Molecular Biology*, **47**: 95-113.
- 176. Ricaud, C. and Ryan, C.C.** (1989): Leaf scald. *In Ricaud, C., B.T. Egan, A.G. Gillaspie Jr. y C.G. Hughes. (Eds.). Diseases of sugarcane. Major Diseases*, pp. 39-58. Elsevier, Amsterdam.
- 177. Rigg, G.P.; Barrett, B. and Roberts, I.S.** (1998): The localization of KpsC, S and T and KfiA, C and D proteins involved in the biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide: evidence for a membrane-bound complex. *Microbiology*, **144**: 2905-2914.
- 178. Roberts, E.J.; Clarke, M.A.; Godshall. M.A. and Parrish, F.W.** (1985): A glucan from sugarcane. *International Sugarcane Journal*, **87**:277-231
- 179. Roberts, E.J.; Godshall, M.E.; Carpenter, F.G. and Clarke M.A.** (1976): Composition of soluble indigenous polysaccharides from sugar cane. *International Sugar Journal*, **78**: 10-12.
- 180. Robertson, D.; Beech, I. and Bolwell, G.P.** (1995): Regulation of the enzymes of UDP-sugar metabolism during differentiation of French bean. *Phytochemistry*, **39**: 21-28.
- 181. Roden, J.; Eardley, L.; Hotson, A.; Cao, Y.Y. and Mudgett, B.B.** (2004): Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**: 633-643.
- 182. Rodrigues, F.; Luiz, A.; Luis, E.; Leite, A. and Arruda, P.** (2001): Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiology Letters*, **203**: 165-171.
- 183. Rodríguez, C.W.; Valdés P. y Martínez M.** (1985b): Formación de polisacáridos de alto peso molecular en distintas variedades de caña de azúcar. *Ciencias de la Agricultura*, **22**: 63-68.
- 184. Rodríguez, C.W.; Valdés, P. y Martínez, M.** (1985a): Los carbohidratos y las proteínas solubles de la caña de azúcar en diferentes etapas de su crecimiento. *Ciencias de la Agricultura*, **24**: 55-61.
- 185. Rogovin, P.; Albrecht, W. and Sohns, V.** (1965): Production of industrial grade polysaccharide B-1459. *Biotechnology and Bioengineering*, **7**: 161-169.

- 186. Romero, F.J.; García, L.A.; Salas, J.A.; Díaz, M. and Quirós, L.M.** (2001): Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry*, **36**: 507–515.
- 187. Rosseti, V.; Garnier, M.; Bove, J.M. and Beretta, M.J.G.** (1990): Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. *Comptes Rendues Academie Sciences. Paris série III*, **310**: 345–349
- 188. Rott, P. and Davis, M.J.** (2000): Leaf scald. In: *A guide to Sugarcane diseases*, pp.163-169. CIRAD and ISSCT. Montpellier, France
- 189. Rott, P.; Mohamed, S.; Klett, P.; Soupa, D.; de Saint-Albin, A.; Feldmann, P. and Letourmy, P.** (1997): Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. *Phytopathology*, **87**: 1202-1213.
- 190. Ryan, C.A.** (1990): Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **28**: 425-449.
- 191. Sacher, J. A.; Hatch, M. D. and Glasziou, K. T.** (1963): The sugar accumulation cycle in sugar cane. III. Physical and metabolic aspects of the cycle in immature storage tissue. *Plant Physiology*, **38**: 348-354.
- 192. Sambaiah, K. and Srinivasan, K.** (1989): Influence of spices and spice principles on hepatic mixed function oxygenase system in rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **26**: 254-258.
- 193. Santos, V.E.** (1993): Producción de xantano. PhD thesis. Madrid, Spain: Universidad Complutense.
- 194. Saumtally, S.; Medan, H. and Autrey, L.J.C.** (1996): Evolution of aerial infection of leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in sugarcane. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists*, **22**: 493-497.
- 195. Săvulescu, T.** (1947): Contribution à la classification des bactériacées phytopathogènes. *Analele Academiei Romane, Memoriile Secțiunii Științifice Seria 111*, **22**, Mem. **4**: 1–26.
- 196. Schiller, J.G.; Bowser, A.M. and Feingold, D.S.** (1973): Partial purification and properties of UDPG dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochimica and Biophysica Acta*, **293**: 1-10.
- 197. Schweickart, R.W. and Quinlan, A.V.** (1989): Kinetics of xanthan production when NH₃-N limits biomass synthesis and glucose limits polysaccharide synthesis. *Journal of Biomechanical Engineering*, **111**: 166-171.

- 198. Shannon, L. M. and Hankins, C. N.** (1981): Enzymatic properties of phytohemagglutinins, *In*: Loewus, F. A., Ryan, C. A. (Eds.), *The Phytochemistry of Cell Recognition and Cell Surface Interactions*, pp. 93-114. Plenum Press, New York and London.
- 199. Shastry, S. and Prasad, MS.** (2002): Extracellular protease from *Pseudomonas* sp. (CL 1457) active against *Xanthomonas campestris*. *Process Biochemistry*, **37**: 611-621.
- 200. Shu, Ch.H. and Yang, Sh.T.** (1990): Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**: 454-468.
- 201. Shu, Ch.H. and Yang, Sh.T.** (1991): Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**:567-574.
- 202. Sieberth, V.; Rigg, G.P.; Roberts, I.S. and Jann, K.** (1995): Expression and characterization of UDPGlc dehydrogenase (Kfid), which is encoded in the type-specific region 2 of the *Eschericia coli* K5 capsule genes. *Journal of Bacteriology*, **177**: 4562-4565.
- 203. Silman, R.W. and Rogovin, P.** (1972): Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*, **14**: 23-31.
- 204. Slodki, M. E.** (1998): Polisacáridos Microbianos, *In*: Enciclopedia de Tecnología Química Kirk-Othmer, Limusa, 1998, traducción española de: Mark H.F., Othmer D.F., Overberger C. G., Seaborg G. T. (ed.), *Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley, New York.
- 205. Smith, A. D.; Datta, S.P.; Howard Smith, G.; Campbell, P.N.; Bentley, R. and McKenzie, H.A.** Eds. (1997). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford, Oxford University Press.
- 206. Solas, M.T., Piñón, D., Avelledo, R., Fontaniella, B., Legaz, M.E. and Vicente, C.** (2003): Ultraestructural changes and production of a xanthan-like polysaccharide associated with scald of sugarcane leaves caused by *Xanthomonas albilineans*. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 351-359.
- 207. Sommer, B.J.; Barycki, J.J. and Simpson, M.A.** (2004): Characterization of human UDP-glucose dehydrogenase. CYS-276 is required for the second of two successive oxidations. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 23590-23596.
- 208. Spicer, A.P., Kaback, L.A.; Smith, T.J. and Seldin, M. F.** (1998): Molecular cloning and characterization of human and mouse UDP-Glucose dehydrogenase genes. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 25117-25124.

- 209. Stahl, E., ed.** (1969): *In Thin-Layer Chromatography*. 2nd ed. Pp. 8555-8909. Springer-Verlag, New York.
- 210. Stankowski, J.D., Mueller, B.E. and Zeller, S.G.** (1993): Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by reductive-cleavage method. *Carbohydrate Research*, **241**: 321-326.
- 211. Stewart, D.C. and Copeland, L.** (1999): Kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from soybean nodules. *Plant Science*, **147**: 119-125.
- 212. Stitt, M.; Huber, S. and Kerr, P.** (1987): Control of photosynthesis and sucrose formation. *In: The Biochemistry of Plants*. P.K. Stumpf y E.E. Conn, (eds), Vol. **3** (J. Preiss, ed.), Academic Press, New York, pp 327-409.
- 213. Strominger, J.L. and Mapson, L.W.** (1957): Uridine diphosphoglucose dehydrogenase of pea seedlings. *Biochemical Journal*, **66**: 567-572.
- 214. Strominger, J.L.; Kalckar, H.M.; Axelrod, J. and Maxwell, E.S.** (1954): Enzymatic oxidation of uridine diphosphate glucose to uridine diphosphate glucuronic acid. *Journal Analytical Chemistry Society*, **76**: 6411-6412.
- 215. Swings, J. and Civerolo, E.** (1993): *Xanthomonas*. Ed. Chapman and Hall. London.
- 216. Tait, M.I., Sutherland, I.W. and Clarke-Sturman, A.J.** (1986): Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. *Journal of general Microbiology*, **132**: 1483-1492.
- 217. Tako, M. and Nakamura, S.** (1984): Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. *Agricultural and Biological Chemistry*, **2**: 2987-2993.
- 218. Tang, J. L.; Liu, YN.; Barber, C.E.; Dow, J.M. and Wootton, JC.** (1991): Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Molecular and General Genetics*, **226**: 409-417.
- 219. Tang, L.; Shah, S.; Chung, L., Carney, J.; Katz, L.; Khosla, C. and Julien, B.** (2000): Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*, **287**: 640-642.
- 220. Tavladoraki, P.; Benvenuto, E.; Trinca, S.; de Martinis, D.; Cattaneo, A. and Galeffi, P.** (1993): Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, **366**: 469-472.
- 221. Tenhaken, R. and Thulke, O.** (1996): Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase. *Plant Physiology*, **112**: 1127-1134.
- 222. Toyoda, K.; Miki, K.; Ichinose, Y.; Yamada, T. and Shiraishi, T.** (1995): Plant lectins induce the production of a phytoalexin in *Pisum sativum*. *Plant and Cell Physiology*, **36**: 798-807.

- 223. Turner, W. and Botha, F. C.** (2002): Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **407**: 209-216.
- 224. Valdés, P. and Rodríguez, C.W.** (1982): Respuestas de los tallos de la caña de azúcar a los cortes. *Ciencias de la Agricultura*, **12**: 118-122.
- 225. Vattuone, M.A.; Prado, F.E.; Sayago, J.E. and Sampietro, A.R.** (1991): Effect of lectins on *Ricinus* invertase. *Phytochemistry*, **30**: 419-422.
- 226. Vicente, C.; Fontaniella, B. and Legaz, M.E.** (2000): Fructan-like polysaccharides produced by sugar beet during deterioration. *International Sugar Journal*, **102**: 250-256.
- 227. Vicente, C.; Mateos, J.L.; Pedrosa, M.M. and Legaz, M.E.** (1991): High-performance liquid chromatography determination of sugars and polyols in extracts of lichens and sugarcane juice. *Journal of Chromatography*, **553**: 271-283.
- 228. Walker, M.J.; Birch, R.G. and Pemberton, J.M.** (1988): Cloning and characterization of an albicidin resistance gene from *Klebsiella oxytoca*. *Molecular Microbiology*, **2**: 443-454.
- 229. Wallis, F.M.; Rijkenberg, F.H.J.; Joubert, J.J. and Martin, M.M.** (1973): Ultrastructural histopathology of cabbage leaves infected with *Xanthomonas campestris*. *Physiological Plant Pathology*, **3**: 371-378.
- 230. Warburg, O. and Christian, W.** (1941): Isolierung and kristallization des Gärungs-ferments Enolase, *Biochemie Zeitschrift*, **310**: 384-421.
- 231. Wegrowki, Y.; Perreau, C.; Bontemps, Y. and Maquart, F.X.** (1998): Uridine diphosphoglucose dehydrogenase regulates proteoglycan expression: cDNA cloning and antisense study. *Biochemistry Biophysics and Research Communications*, **250**: 206-211.
- 232. Welch, R.A.; Burland, V.; Plunkett, G.; Redford, P.; Raski, D.; Buckles, E.L.; Liou, S.R.; Boutin, A.; Hackett, J.; Stroud, D.; Mayhew, G.F.; Rose, D.J.; Zhou, S.; Schwartz, D.C.; Perna, N.T.; Mobley, H.L.T.; Donnenberg, M.S. and Blattner, F.R.** (2002): Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *E. coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**: 17020-17024.
- 233. Woiciechowski, A.L.; Soccol, C.R.; Rocha, S. and Pandey, A.** (2004): Xanthan gum production from cassava bagasse hydrolysate with *Xanthomonas campestris* using alternative sources of nitrogen. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **118**: 305-312.
- 234. Zhang, L. and Birch, R.G.** (1996): Biocontrol of sugarcane leaf scald disease by an isolate of *Pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. *Letters in Applied Microbiology*, **22**: 132-136.

- 235. Zhang, L. and Birch, R.G.** (1997a): The gene for albicidin detoxification from *Pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *Xanthomonas albilineans* to sugarcane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**: 9984–9989.
- 236. Zhang, L. and Birch, R.G.** (1997b): Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugarcane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Applied Microbiology*, **82**: 389–398.
- 237. Zhang, L.; Xu, J. and Birch, R.G.** (1998a): Factors affecting biosynthesis by *Xanthomonas albilineans* of albicidin antibiotics and phytotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, **85**: 1023–1028.
- 238. Zhang, L.; Xu, J. and Birch, R.G.** (1998b): High affinity ligand binding by albicidin antibiotic to the albA resistance gene product from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiology*, **144**: 555–559.
- 239. Zhang, L.; Xu, J., and Birch, R.G.** (1999): Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nature Biotechnology*, **17**:1021–1024.
- 240. Zhu, Y.; Yoshiura, Y.; Kikuchi, K.; Aida, K. and Thomas, P.** (1999): Cloning and phylogenetic relationship of red drum somatolactin cDNA and effects of light on pituitary somatolactin mRNA expression. *General and Comparative Endocrinology*, **113**: 69–79.